Die Zusammensetzung des ätherischen Öles von Heterotheca inuloides Cass. («Mexikanische Arnikablüten«) und weitere lipophile Inhaltsstoffe

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Richard Schneider
aus Schweinfurt

Düsseldorf
1984

Die Zusammensetzung des ätherischen Öles von Heterotheca inuloides Cass. („Mexikanische Arnikablüten") und weitere lipophile Inhaltsstoffe

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Richard Schneider

aus Schweinfurt

Düsseldorf

1984

Referent	: Professor Dr. G. WILLUHN
Korreferent	: Professor Dr. U. KUCKLÄNDER
Tag der mündlichen Prüfung	: 5. Juli 1984

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr. G. Willuhn

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf.

Für die stets großzügig gewährte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. G. Willuhn herzlich.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MORPHOLOGISCH-ANATOMISCHE BESCHREIBUNG DER HETEROTHECAE FLOS	5
3.	DAS ÄTHERISCHE ÖL	18
3.1.	Gehalt in der Droge und Charakterisierung durch physikalische und chemische Kennzahlen	18
3.2.	Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung	18
3.2.1.	Gaschromatographische Trennung	18
3.2.2.	Auftrennung des ätherischen Öles in Kohlenwasserstoffe und O-haltige Verbindungen	20
3.2.3.	Die Zusammensetzung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion	22
3.2.3.1.	Isolierung und Identifizierung von Cadalin (I)	22
3.2.3.2.	Identifizierung weiterer Terpenkohlenwasserstoffe durch GC- und GC/MS-Analyse	27
3.2.3.3.	Identifizierung einiger Terpenkohlenwasserstoffe des ätherischen Öles der Blüten von Arnica montana	32
3.2.4.	Zur Zusammensetzung der Fraktion der sauerstoffhaltigen Komponenten	35
3.2.4.1.	Isolierung und Identifizierung von 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin (Verbindungen XXI und XXII)	35
3.2.4.2.	Isolierung und Identifizierung von 4-Methoxyisocadalin (Verbindung XXIII)	42
3.2.4.3.	Identifizierung weiterer Komponenten durch GC- und GC/MS-Analyse	48

3.2.4.4.	Identifizierung von im ätherischen Öl auftretenden Fettsäuren	50
3.3.	Obersicht über die Zusammensetzung des ätherischen Öles	53
4.	DIE ZUSAMMENSETZUNG DES PETROLETHEREXTRAKTES	55
4.1.	Fraktionierung des Petroletherextraktes	55
4.2.	Isolierung der bereits im ätherischen Öl identifizierten Verbindungen I, XXI und XXII aus dem Petroletherextrakt (Cadalin, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin)	56
4.3.	Isolierung und Identifizierung von 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon (Verbindung XXXVI)	56
4.4.	Isolierung und Identifizierung von 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren (Verbindung XXXVII)	62
4.5.	Triterpene	69
4.6.	Die Zusammensetzung der Sterinfraktion	80
4.7.	Dünnschichtchromatographische Unterscheidung der Blütenkörbchen von H. inuloides und A. montana anhand der ätherischen Öle und der Petroletherextrakte. Zuordnung der identifizierten Verbindungen	88
4.8.	Identifizierung von Caryophyllenoxid in A. montana-Blüten	90
5.	DISKUSSION	92
6.	ZUSAMMENFASSUNG	99
7.	EXPERIMENTELLER TEIL	102
7.1.	Herkunft der Droge	102
7.2.	Spektroskopische Methoden	102

7.3.	Bestimmung der physikalischen Konstanten	103
7.4.	Bestimmung der chemischen Kennzahlen	103
7.5.	Chromatographische Methoden	104
7.5.1.	Dünnschichtchromatographie	104
7.5.2.	Säulenchromatographie	106
7.5.3.	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie	107
7.5.4.	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	107
7.5.5.	Gaschromatographie	107
7.6.	Derivatisierungen	109
7.6.1.	Bildung der Acetate	109
7.6.2.	Bildung der Fettsäuremethylester	109
7.7.	Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles	110
7.8.	Fraktionierung des ätherischen Öles	110
7.9.	Cadalin (Verbindung I)	112
7.10.	7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Verbindung XXI) und 7-Hydroxycadalin (Verbindung XXII)	113
7.11.	4-Methoxyisocadalin (Verbindung XXIII)	114
7.12.	Fraktionierung des Petroletherextraktes	115
7.12.1.	Cadalin (Verbindung I)	116
7.12.2.	7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxy-cadalin (Verbindung XXI und Verbindung XXII)	116
7.12.3.	4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon (Verbindung XXXVI)	117
7.12.4.	2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren (Verbindung XXXVII)	117
7.12.5.	Triterpene	118
7.12.6.	Sterine	119
7.13.	Arnica montana	119
7.13.1.	Herkunft	119

7.13.2. Ätherisches Öl 120

7.13.3. Petroletherextrakt 120

8. ANHANG MASSENSPEKTREN 121

9. LITERATURVERZEICHNIS 136

1. Einleitung und Problemstellung

Die europäische Asteraceae Arnica montana L., der „Bergwohlverleih", besitzt in der Volksheilkunde eine sehr breite medizinische Anwendung, die z.T. auch von der Schulmedizin übernommen worden ist. Ihre Blüten waren zeitweise in den Pharmakopoen fast aller Länder offizinell. Sie werden heute noch im DAB 8 und in den Arzneibüchern 13 weiterer Länder geführt. Die Droge führt als Bestandteil von ca. 270 Fertigarzneimitteln zur Zeit die Rangliste der Phytopharmaka an. Arnica montana steht in Deutschland unter Naturschutz und ist darüber hinaus in die Liste der besonders gefährdeten Pflanzenarten aufgenommen, die durch das Washingtoner Artenschutzabkommen von 1981, dem auch die Bundesrepublik Deutschland beigetreten ist, einen besonderen Schutz erfahren sollen. Seit Jahren wird nicht zuletzt wegen bestehender Versorgungsengpässe immer wieder über Verfälschungen der „Arnicae flos" berichtet. Wiederholt wurde auf eine „unechte mexikanische Arnika" hingewiesen, ohne daß Angaben über die Stammpflanze gemacht wurden [1,2,3]. Nach Willuhn u. Röttger [4] handelt es sich hierbei um die Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides Cass., einer in Mexiko heimischen Asteraceae aus der Tribus Astereae. Diese Pflanze ist in Mexiko sehr verbreitet. Man findet sie im Valle de Mexiko in Höhen von 1700 bis 3000 m sowie in höheren Lagen der Staaten Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Morelos, Hidalgo, Michoacan, Jalisco und Guanajuato. Sie wächst dort in größeren Beständen an Straßenseiten und Feldrändern auf steinig-sandigen Böden und auch in Pinus- und Quercus-Beständen. Die Blütezeit reicht von Juni bis Oktober.

Die Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides werden derzeit im Tonnenmaßstab auf dem europäischen Drogenmarkt als „Mexikanische Arnikablüten" gehandelt. Das Ausweichen auf diese Droge hat seine Ursache sicher darin, daß sie in Mexiko dieselbe medizinische Anwendung findet, wie bei uns die Arnica montana. Heterotheca inuloides gehört unter dem Namen „Arnica" zu den bekanntesten Arzneipflanzen Mexikos. Unter diesem Namen sind ihre Blütenkörbchen auch in ethnographischen Museen unter den 40 bekanntesten und überlieferten Drogen der einheimischen Bevölkerung ausgestellt. Andere Namen sind „Falsa Arnica" (d.h. falsche Arnica), „Arnica del pais" (Arnika des Landes), „Acahual" oder „Cuauteteco" [5]. Von den Indios werden auf den Märkten neben den getrockneten Blütenkörbchen auch ganze frische oder getrocknete blühende Pflanzen angeboten. Das Hauptanwendungsgebiet ist die äußerliche lokale Behandlung von Prellungen, Verstauchungen und Verletzungen, sowie auch der Gebrauch als lokales Wundmittel. Damit entspricht es vollständig dem Anwendungsgebiet der Blüten von Arnica montana. Daneben wurde und wird die Droge jedoch auch oral verabreicht gegen Sumpffieber, Fieber und Bronchitis, als Tonikum sowie als diuretisch wirksames, schweißtreibendes und brechreizerregendes Mittel [6,7,8,9]. Wie bei Arnica montana werden hierbei gelegentlich auch die Blätter und Wurzeln verwendet [6].

Ober die Inhaltsstoffe von Heterotheca inuloides ist nur wenig bekannt. Urbinia [10], Suc [11] und Martinez [7] zitieren eine Untersuchung von Bruciaga [12], der als Inhaltsstoffe der Blütenkörbchen ein Harz, eine gelbfärbende Komponente, einen gummiähnlichen Stoff, Gerbstoffe, ätherisches Öl, Mine-

ralsalze, Oxalsäure, Glucose, eine Fettsäure und ein bitteres Prinzip angibt. In neuerer Zeit haben Bohlmann und Zdero [13] Heterotheca inuloides chemisch bearbeitet. In den Wurzeln identifizierten sie zwei Polyacetylene. Aus dem Kraut isolierten sie neben Quercetin und Cadalin fünf neue Sesquiterpene: 4-Hydroxyisocadalin, 4-Methoxyisocadalin, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin, 1-Isopropyl-4,6-dimethyl-1,2,8,8a-tetrahydro-2-naphthol und 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon. Nach Willuhn und Röttger [4] führen die Blütenkörbchen 0,44 % ätherisches Öl und 0,73 % Flavonoide. Sie isolierten desweiteren Rutin und machten dünnschichtchromatographisch das Vorkommen von Luteolin, Luteolin-7-glucosid und Quercitrin wahrscheinlich. Alkaloide und Saponine konnten von ihnen nicht nachgewiesen werden. Auch Sesquiterpenlactone, die Hauptwirkstoffe der Arnica montana, konnten bei diesen Untersuchungen nicht gefunden werden. Die Wirkstoffe der volksmedizinisch verwendeten Blütendroge sind nach den bisherigen Untersuchungen vor allem bei den Flavonoiden und dem ätherischen Öl zu suchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war

1.) die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung des ätherischen Öles
2.) die Analyse weiterer lipophiler Bestandteile der Droge, insbesonders der Triterpene und Sterine
3.) eine morphologisch-mikroskopische Bearbeitung der Blütenkörbchen, die vor allem analytisch geeignete morphologisch-anatomische Merkmale für ihre Identitätsprüfung liefern sollte.

Durch diese Untersuchungen sollten nicht nur die chemischen und anatomischen Kenntnisse über diese volksmedizinisch genutzte Blütendroge erweitert werden, sondern auch gleichzeitig die Unterschiede zu den offizinellen Arnikablüten aufgezeigt werden. Die aus diesem Grunde erfolgte chromatographische Auftrennung des ätherischen Öles und des Petrolether-Extraktes der Blüten von Arnica montana führte zur Identifizierung einiger bisher noch nicht beschriebener Inhaltsstoffe der offizinellen Droge.

2. Morphologisch-anatomische Beschreibung der Heterothecae flos

Morphologische Beschreibung

Die Droge besteht aus den getrockneten, ganzen, oft jedoch zerfallenen Blütenkörbchen mit gelben Zungen- und Röhrenblüten. Hin und wieder findet sich an den Pseudanthien ein ca. 3 cm (gelegentlich 5-7 cm) langer Stengel. Die Droge besitzt einen schwach aromatischen, an Arnikablüten erinnernden Geruch und einen leicht bitteren, aromatisch-herben Geschmack. Die isoliert vorliegenden gelben Zungenblüten sind stark eingerollt, die Röhrenblüten wenig auffallend. Charakteristisch sind grauweiße, borstige Pappushaare, die am oberen Ende der braunen, ovalen Fruchtknoten (Achänen) der Röhrenblüten ansitzen, den Zungenblüten jedoch fehlen, und der Droge insgesamt ein grauweißes Aussehen verleihen. Daneben finden sich einzelne von Blüten befreite Blütenstandsböden mit Hüllkelchblättern (s. Abb. 1).

Der ca. 5-6 mm breite Blütenstandsboden ist flach bis leicht gewölbt und nicht behaart, d.h. nackt. Er trägt einen Hüllkelch aus ca. 55-70 schmalen, lanzettlichen, ca. 7-9 mm langen, 1-3 mm breiten, ganzrandigen Involucralblättern, die in mehreren Reihen angeordnet sind. Ihre grünlich-braune Außenseite ist an der Basis schwach, zur Spitze hin stark behaart. Auf der Innenseite kommen Haare nur selten vor.

Die 19-32 weiblichen Zungen- oder Randblüten sind 1,5-1,7 cm lang. Ihre Korolle ist im unteren Bereich röhrig und außen behaart. Sie geht in eine ca. 3 mm breite und ca. 1,4-1,6 cm lange, oben dreizähnige Zunge über. Die Zunge wird in ihrer

Abb. 1: Blütenkörbchen (a), Blütenstandsboden mit Hüllkelch (b), Zungenblüten (c), Röhrenblüten (d), Achänen mit Pappus (e) und Hüllkelchblätter (Ober- und Unterseite; f) von Heterothecae flos

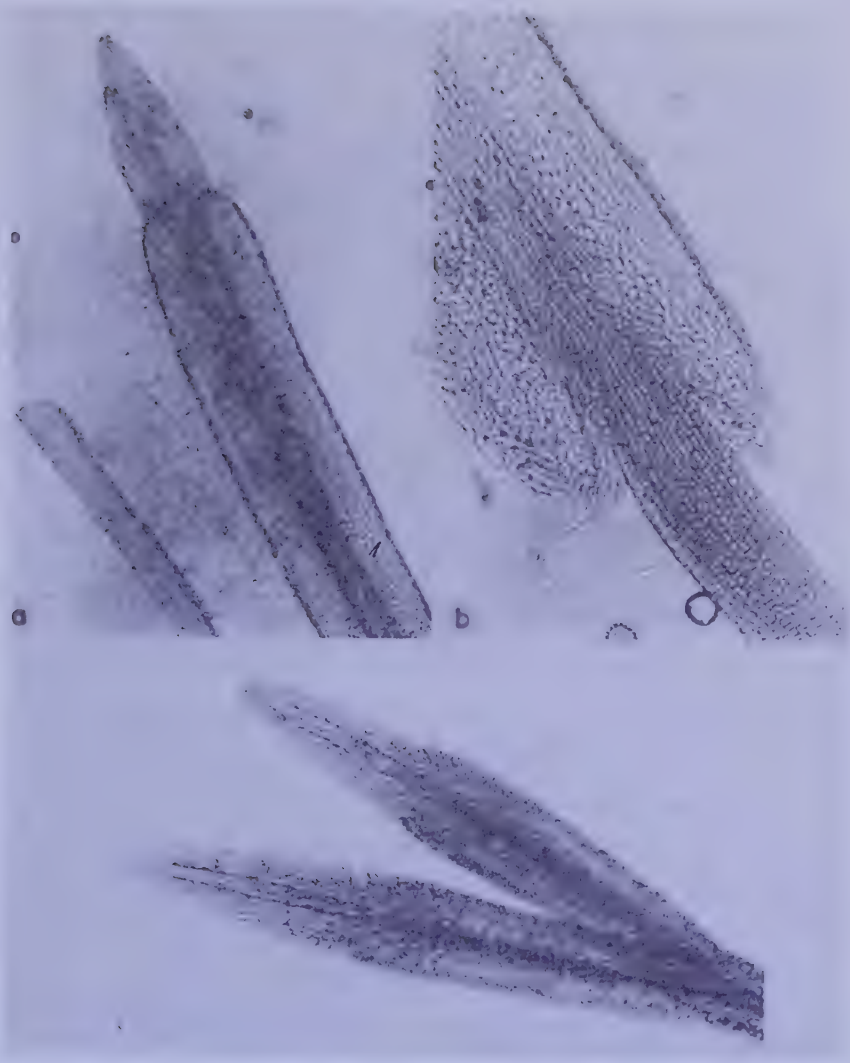


Abb. 2: Konnektivzipfel (a), Antherenbasis (b) und Narbenschenkel (c) der Röhrenblüten von Heterothecae flos

ganzen Länge von 5-8 parallel verlaufenden Nerven durchzogen. Der braune, 2-3 mm lange Fruchtknoten ist behaart und trägt, wie bereits erwähnt, keinen Pappus. Der Griffel ist etwa ein Drittel so lang wie die Zunge und verzweigt sich zu zwei leicht V-förmig auseinanderstehenden Narbenschenkeln, die nur an der Außenseite papillös sind.

Die zahlreichen, zwittrigen Röhren- oder Scheibenblüten sind ca. 8 mm lang. Ihre Korolle ist im unteren Teil röhrig und außen behaart. In halber Höhe erweitert sich die Röhre und läuft in einen fünfspaltigen Saum mit schwach zurückgekrümmten, dreieckigen Kronblattzipfeln aus. Die fünf Staubblätter sind ca. 6-7 mm lang und mit ihren Filamenten etwa in der Mitte der Kronröhre inseriert. Die Antheren sind mit ihrer Kutikula zu einer Röhre verklebt. Die Konnektivzipfel sind abgesetzt und lanzenspitzenartig. Die Antherenbasis ist pfeilflügelartig. Der Griffel ist ebenso gebaut wie bei den Zungenblüten (s. Abb. 2). Der braune, 1-2 mm lange, ovale Fruchtknoten ist dicht mit nach oben gerichteten Haaren besetzt. An der Spitze trägt er einen zweireihigen, aus grauweißen, sehr brüchigen, borstigen Haaren bestehenden Pappus. Der äußere Kranz ist kürzer, ca. 1 mm lang, der innere Kranz erreicht die Länge der Kronröhre (bis 7 mm).

Mikroskopische Merkmale

Blütenstandsboden: Er besteht aus unregelmäßig-buchtig geformten Parenchymzellen, zwischen denen sich große Interzellularen befinden, die dem Gewebe ein schwammartiges Aussehen verleihen (s. Abb. 3).

Hüllkelchblätter: Die Zellen der einzellreihigen, inneren Epidermis (morphologische Oberseite) sind langgestreckt und spaltöffnungsfrei. Nur selten treten hier einzelne Gliederhaare auf (s. Abb. 4). In der äußeren, wellig-buchtigen Epidermis finden sich anomocytische Spaltöffnungsapparate mit 4 bis 6 Nebenzellen (s. Abb. 5). Sie trägt zahlreiche, unterschiedlich gebaute Haare: Bis zu 1660 µm lange Gliederhaare, aus maximal 9 Zellen bestehend, die mit Ausnahme der kurzen Basalzellen und der teilweise verlängerten Endzelle alle ungefähr gleich lang sind. Bis zu 450 µm lange, ein- oder zweizellreihige Drüsenhaare mit rundlichen, mehrzelligen Köpfchen (s. Abb. 6).

Zungen- oder Randblüten: Die Epidermiszellen der Korolle sind auf beiden Seiten polygonal bis langgestreckt und schwach papillös. Die Kutikula zeigt eine deutliche, quer zur Längsrichtung der Zellen verlaufende Streifung (s. Abb. 7). An der Außenseite, besonders am Obergang zum röhrenförmigen Teil, befinden sich zahlreiche, bis zu 500 µm lange, einzellreihige, aus 4-6 Zellen bestehende Gliederhaare. Besonders zahlreich treten hier jedoch ca. 260-470 µm lange und 25-50 µm breite, aus zwei Zellreihen bestehende Gliederhaare auf (s. Abb. 8). Drüsenhaare fehlen. Im Mesophyll der Kronblattbasis kommen zahlreiche Einzelkristalle und vereinzelte Kristalldrusen vor. Das Griffelgewebe führt zahlreiche Drusen. Der Fruchtknoten ist mit zahlreichen, nach oben gerichteten schlanken, peitschenartigen Zwillingshaaren besetzt, die eine getüpfelte Zwischenwand besitzen und bis zu 660 µm lang sind (s. Abb. 9). Phytomelaneinlagerungen fehlen.

Röhren- oder Scheibenblüten: Die Korollblattepidermis zeigt das gleiche mikroskopische Bild wie bei den Zungenblüten. Die Papillen an den Kronblattzipfeln zeigen keine Kutikularstreifung. Auf der Außenseite der Korolle finden sich die gleichen Haartypen wie bei den Zungenblüten. Im Mesophyll der Basis kommen ebenfalls Einzelkristalle und Kristalldrusen vor. Das Endothezium der Antheren zeigt bügelförmige Wandverdickungen. Die gelben ca. 25 µm großen Pollenkörner besitzen eine grobstachelige Exine und drei Keimporen (s. Abb. 10). Auch hier finden sich im Griffelgewebe zahlreiche Kristalldrusen. Der Fruchtknoten ist wesentlich stärker behaart als bei den Zungenblüten. Es handelt sich ebenfalls um peitschenartige, schlanke Zwillingshaare. Er trägt einen zweireihigen Pappus, dessen äußerer Kreis kürzer ist. Die schlanken Pappusborsten bestehen aus mehreren Reihen gestreckter Haarzellen mit abstehenden spitzen Enden. Die Spitze des Pappus besteht nur noch aus zwei bis drei Haarzellen (s. Abb. 11).

In Tab. 1 sind die wesentlichen morphologisch-anatomischen Merkmale zusammengefaßt, an denen sich die Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides und Arnica montana unterscheiden lassen.

Tab. 1: Morphologische und anatomische Unterscheidungsmerkmale zwischen Heterothecae flos und Arnicae flos

	Heterothecae flos	Arnicae flos
Hüllkelch	55-70 Hüllkelchblätter mehrreihig Ø ca. 24 mm Gliederhaare, Drüsenhaare, keine Asteraceendrüsenhaare	20-40 Hüllkelchblätter meist zweireihig Ø ca. 20-36 mm Gliederhaare, Drüsenhaare, Asteraceendrüsenhaare
Blütenstandsboden	Ø 5-6 mm nicht behaart	Ø 4-6 mm steif behaart
Zungenblüten	weiblich; 19-32 Länge: 15-17 mm kein Pappus Fruchtknoten: 2-3 mm lang, oval peitschenartige Zwillingshaare, getüpfelt keine Asteraceendrüsenhaare kein Phytomelan Korolle: Basis: ein- und zweireihige Gliederhaare, Einzelkristalle, Drusen Zunge: 5-8 Nerven dreizähnig Narbenschenkel leicht V-förmig auseinanderstehend, nur die Außenseite papillös	weiblich; 14-20 Länge: bis 30 mm mit Pappus Fruchtknoten: 4-6 mm lang, schlank breite Zwillingshaare, getüpfelt Asteraceendrüsenhaare Phytomelan Korolle: Gliederhaare, Asteraceendrüsenhaare Zunge: 8-12 Nerven dreizähnig Narbenschenkel weit auseinanderstehend, allseits papillös

Fortsetzung von Tabelle 1:

	Heterothecae flos	Arnicae flos
Röhren-blüten	ca. 8 mm lang, zwittrig Pappus: doppelt; äußerer Kranz kürzer, ca. 1 mm lang; innerer Kranz so lang wie die Korolle Fruchtknoten: 1-2 mm lang, oval peitschenartige Zwillingshaare, getüpfelt keine Asteraceendrüsenhaare kein Phytomelan Kronröhre: Basis: ein- und zweireihige Gliederhaare Einzelkristalle, Drusen Narbenschenkel leicht V-förmig auseinanderstehend, nur die Außenseite papillös Anthere: Basis pfeilflügelartig Konnektivzipfel abgesetzt, lanzenspitzenartig	ca. 15 mm lang, zwittrig Pappus: einfach; so lang wie die Kronröhre Fruchtknoten: 4-6 mm lang, schlank breite Zwillingshaare, getüpfelt Asteraceendrüsenhaare Phytomelan Kronröhre: Gliederhaare Asteraceendrüsenhaare Narbenschenkel weit auseinanderstehend, allseits papillös Anthere: Basis abgerundet Konnektivzipfel nicht abgesetzt

Abb. 3: Parenchymzellen des Blütenstandsbodens

Abb. 4: Innere Epidermis der Hüllkelchblätter

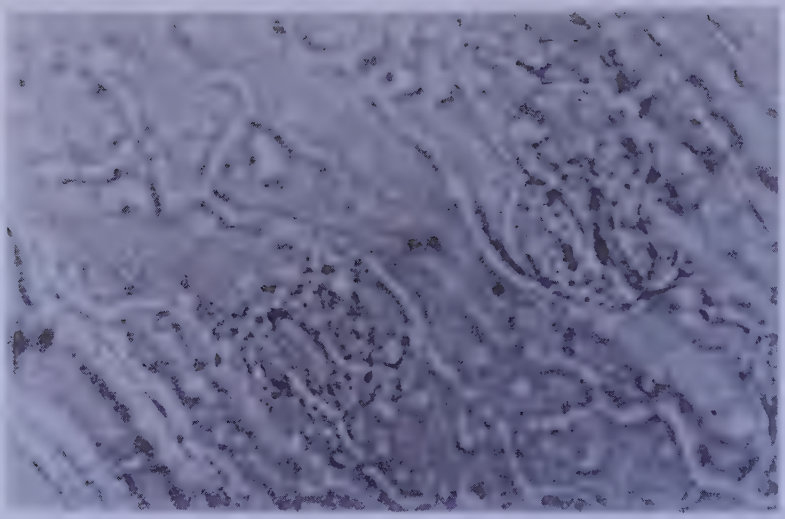


Abb. 5: Äußere Epidermis der Hüllkelchblätter mit anomocytischen Spaltöffnungen

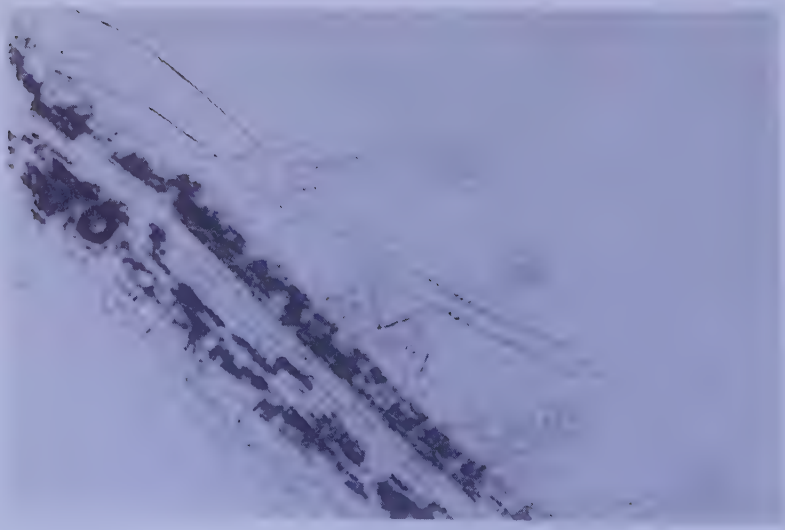


Abb. 6: Behaarung der Hüllkelchblätter

Abb. 7: Epidermis der Korolle der Zungenblüten mit Kutikularstreifen und durchscheinenden Öltröpfchen

Abb. 8: Zweireihige Gliederhaare der Zungenblüten

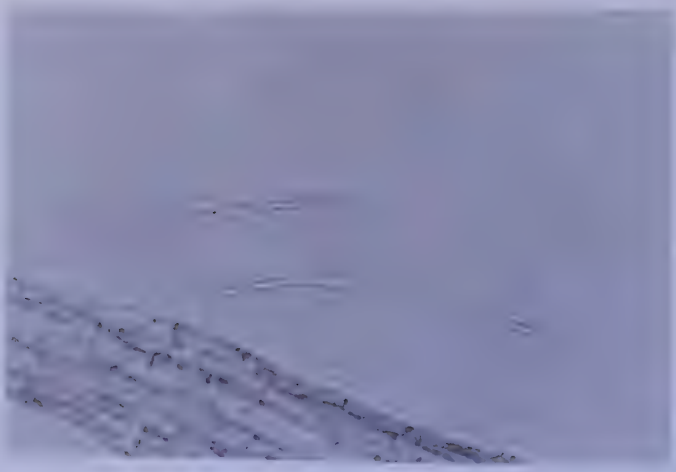


Abb. 9: Peitschenartige Zwillingshaare des Fruchtknotens

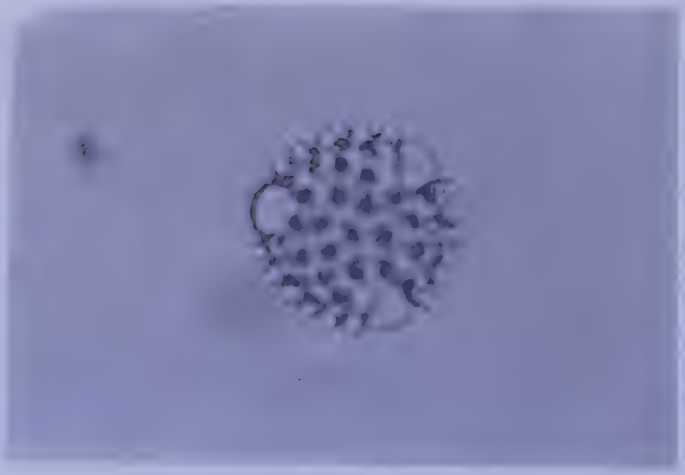


Abb. 10: Pollen mit Keimporen

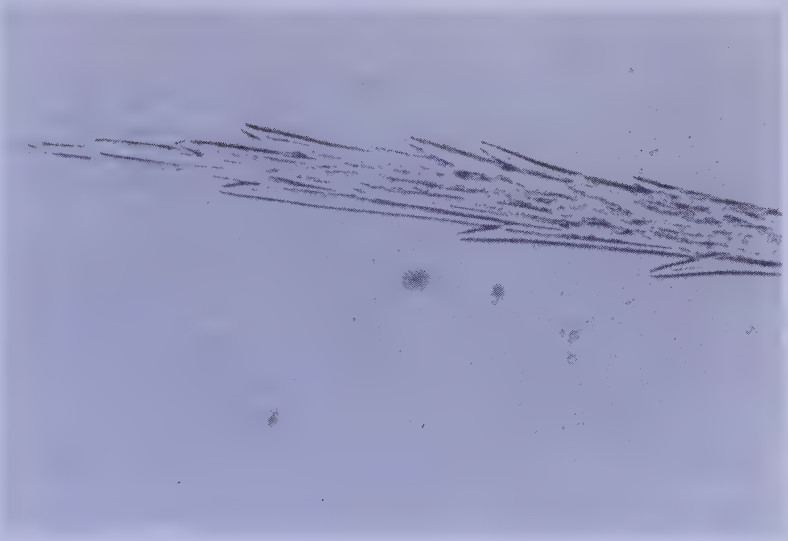


Abb. 11: Spitze einer Pappusborste

3. Das ätherische Öl

3.1. Gehalt in der Droge und Charakterisierung durch physikalische und chemische Kennzahlen

Der Gehalt an ätherischem Öl in der aus dem Handel bezogenen Blütendroge wurde mit der „Karlsruher Apparatur" bestimmt. Er lag bei 0,25 %. Das abgetrennte ätherische Öl besitzt eine rötlich-braune Farbe und ähnelt im Geruch dem ätherischen Öl der Blütenkörbchen von Arnica montana. Im Gegensatz zu diesem ist es jedoch bei Zimmertemperatur flüssig. Eine erste Charakterisierung des Öles erfolgte durch die Bestimmung der üblichen physikalischen und chemischen Kennzahlen. Die ermittelten Konstanten sind in Tabelle 2 (s.S. 19) wiedergegeben und den bekannten Werten des Blütenöles von Arnica montana gegenübergestellt. Außer durch ihre unterschiedliche Konsistenz bei Zimmertemperatur unterscheiden sich beide Öle deutlich in ihren chemischen Kennzahlen, wodurch bereits auf eine unterschiedliche Zusammensetzung hingewiesen wird.

3.2. Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung

3.2.1. Gaschromatographische Trennung

Das ätherische Öl wurde gaschromatographisch* zur weiteren

---

* Im Folgenden wird für gaschromatographisch und Gaschromatographie die Abkürzung gc bzw. GC, für dünnschichtchromatographisch und Dünnschichtchromatographie dc bzw. DC und für säulenchromatographisch und Säulenchromatographie sc bzw. SC verwendet.

Charakterisierung an einer OV-101 Kapillarsäule (System 2) aufgetrennt und mit dem unter identischen Bedingungen aufgetrennten ätherischen Öl der offizinellen Arnikadroge verglichen. Beide Öle unterscheiden sich deutlich in ihrer Zusammensetzung (s. Abb. 12). Das Öl von Heterotheca inuloides ist nicht so komponentenreich wie das der Arnica montana-Blüten. Fünf Verbindungen bilden die Hauptkomponenten. Im Vergleich zu diesen treten die weiteren Substanzen nur in relativ geringer Konzentration auf.

Tab. 2: Physikalische und chemische Kennzahlen des ätherischen Öles von Heterothecae flos (Zum Vergleich die entsprechenden Werte für das ätherische Öl von Arnicae flos)

Ölgehalt und Kennzahlen	Heterothecae flos	Arnicae flos
Gehalt an äther. Öl	0,25 %	0,23 - 0,35 %
Schmelzpunkt	flüssig	23 - 24° C
spez. Drehung	0°	n.b.
Dichte	0,964	n.b.
Brechungsindex n_D^{20}	1,5265	n.b.
Säurezahl	20 - 21	62 - 127
Verseifungszahl	34 - 36	85 - 159
Esterzahl	14 - 15	23 - 34
Jodzahl	85 - 90	n.b.

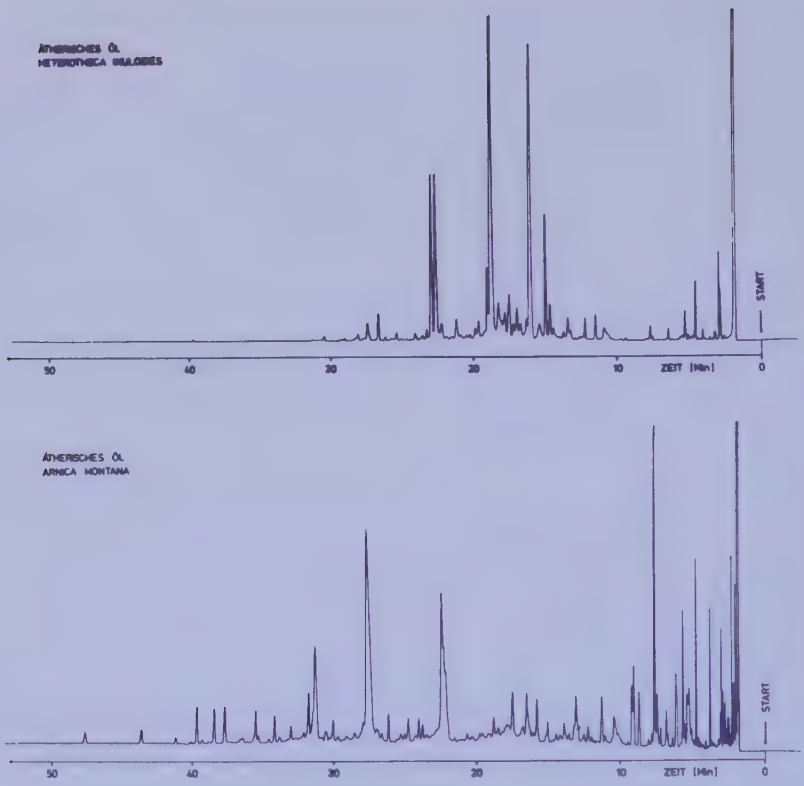


Abb. 12: Kapillargaschromatogramm des ätherischen Öles der Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides und Arnica montana (System 2)

3.2.2. Auftrennung des ätherischen Öles in Kohlenwasserstoffe und O-haltige Verbindungen

Zur Isolierung und Identifizierung der Bestandteile komplex zusammengesetzter ätherischer Öle ist eine sc Auftrennung des Öles an Kieselgel mit n-Pentan und Ether in eine Fraktion der Kohlenwasserstoffe und eine Fraktion der O-haltigen Verbindungen üblich [14]. Um hierbei Umlagerungen von labilen

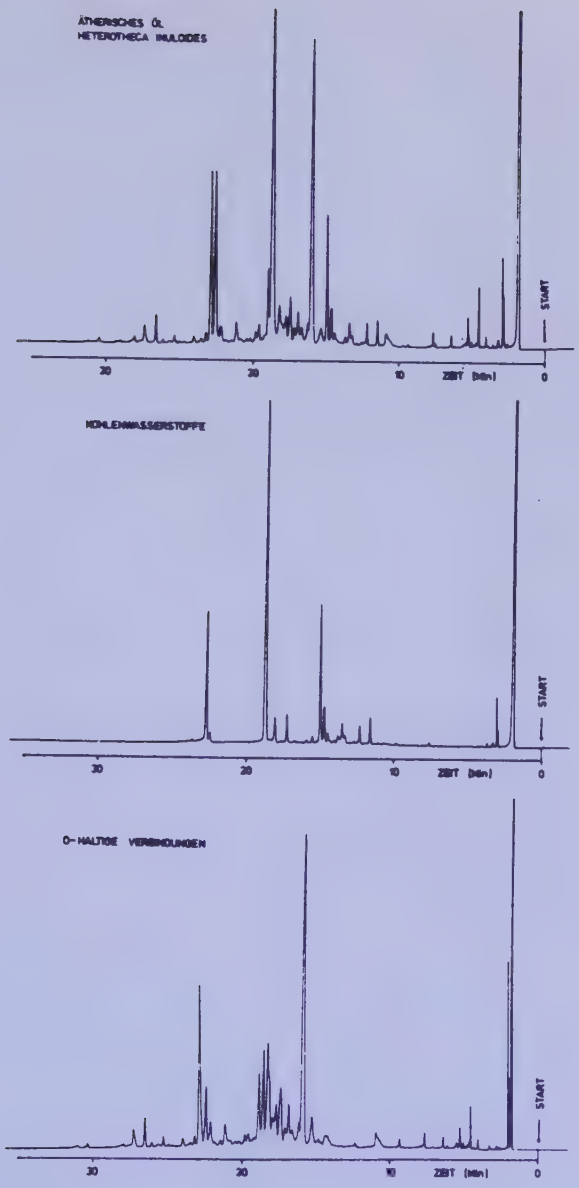


Abb. 13: Kapillargaschromatogramm des Gesamtöles, der abgetrennten Kohlenwasserstoffe und der Fraktion der O-haltigen Verbindungen (System 2)

Substanzen zu vermeiden, wird das Kieselgel zuvor mit HCl und Ammoniak behandelt, jeweils mit Wasser neutralgewaschen, getrocknet und auf einen Wassergehalt von 7 % eingestellt [14,15].

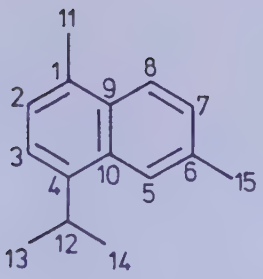
Die auf diesem Wege durchgeführte Fraktionierung von 2 g ätherischem Öl lieferte nach Elution mit n-Pentan 480 mg Terpenkohlenwasserstoffe und 1,374 g einer Fraktion mit O-haltigen Verbindungen.

Die gc Auftrennung dieser Teilfraktionen zeigte, daß von den fünf Hauptkomponenten drei in der Kohlenwasserstoff-Fraktion und zwei in der Fraktion der sauerstoffhaltigen Verbindungen zu finden sind (s. Abb. 13).

3.2.3. Die Zusammensetzung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion

3.2.3.1. Isolierung und Identifizierung von Cadalin (I)

Versuche, die in der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion auftretende Hauptkomponente des ätherischen Öles durch präparative HPLC an Kieselgel mit n-Pentan bei -15° C [16] zu isolieren, waren erfolglos. Deshalb wurden die Kohlenwasserstoffe sc an mit $AgNO_3$ imprägniertem Kieselgel aufgetrennt [17]. Es wurden drei Fraktionen erhalten. Die Hauptkomponente befand sich, von den übrigen Bestandteilen weitgehend abgetrennt, in der mittleren Fraktion. Die endgültige Reindarstellung gelang durch präparative HPLC dieser Fraktion an RP-8 Material mit $MeOH/H_2O$ (85/15) unter Zusatz von 1 g $AgNO_3$ pro Liter Elutionsmittel [18]. Danach lagen 33 mg einer gc reinen, leicht gelblichen öligen Substanz vor.



CADALIN [I]

Im Massenspektrum (Abb. 14) zeigte die Verbindung einen intensiven Molekülpeak bei m/z 198. Die ersten Folgefragmente bei m/z 183 (Basispeak) und 168 [M^+- 15] bzw. [M^+- 15 - 15] weisen auf die Abspaltung von einer bzw. zwei Methylgruppen hin.

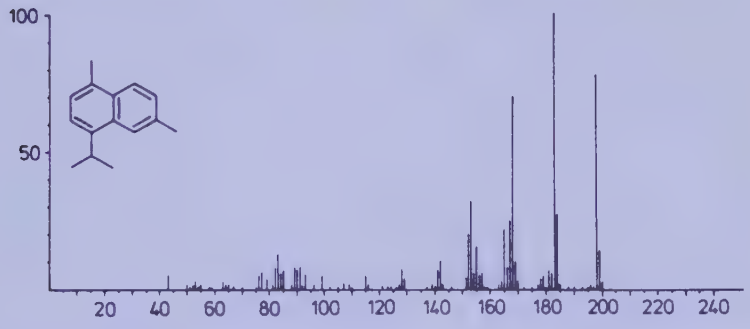


Abb. 14: Massenspektrum von Cadalin
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

Das IR-Spektrum (Abb. 15) war identisch mit dem Literaturspektrum des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs Cadalin [19,20]. Es zeigt die Banden für einen Aromaten bei 1620, 1600 und 1510 cm^{-1} und ein Dublett bei 1380 und 1360 cm^{-1} für die Isopropylgruppe.

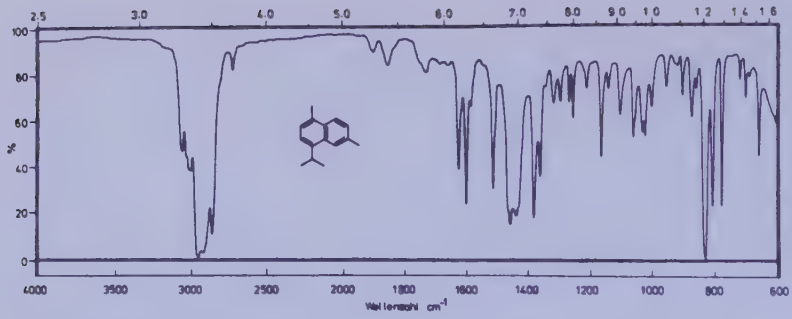


Abb. 15: IR-Spektrum von Cadalin (Film)

Auch das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 16 und Tab. 3) belegte eindeutig, daß es sich bei der isolierten Verbindung um Cadalin handelte. Die Signale für die beiden am Aromaten lokalisierten Methylgruppen (CH_3 an C-1 und CH_3 an C-6) erscheinen als Singuletts bei 2,54 bzw. 2,63 ppm und die für die beiden Methylgruppen des Isopropylrestes als Dublett bei 1,37 ppm. Das mit den Methylgruppen des Isopropylrestes koppelnde Methin-Proton (H-12) ruft ein Multiplett (qq) bei 3,71 ppm hervor. Im Resonanzbereich der aromatischen Protonen finden sich die Signale für die restlichen fünf Protonen mit den für Cadalin zu erwartenden Aufspaltungsbildern. Die ^{1}H-NMR-Daten stimmen insgesamt mit den von Bohlmann u. Zdero [13] für Cadalin angegebenen Daten überein (s. Tab. 3). Damit handelt es sich bei der Hauptkomponente des ätherischen Öles eindeutig um den Sesquiterpenkohlenwasserstoff Cadalin.

Tab. 3: ^{1}H-NMR-Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten von Verbindung I (400 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; innerer Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; q: Quartett; m: Multiplett)

	Verbindung I			Cadalin[1)]		
Protonen	δ (ppm)	J	Hz	δ (ppm)	J	Hz
H-2	7,20 d (br)	2/3	8,0	7,25 d (br)	2/3	8,5
H-3	7,26 d			7,27 d		
H-5	7,90 s (br)	5/7	1,5	7,91 s (br)	5/7	1,5
H-7	7,33 dd	7/8	8,5	7,34 dd	7/8	8,5
H-8	7,90 d			7,91 d		
CH_3 an C-1	2,54 s			2,55 s		
H-12	3,71 m	12/13	7,0	3,71 qq	12/13	7,0
CH_3 an C-12	1,37 d	12/14		1,38 d	12/14	
CH_3 an C-12						
CH_3 an C-6	2,63 s			2,64 s		

1) Bohlmann u. Zdero [13]

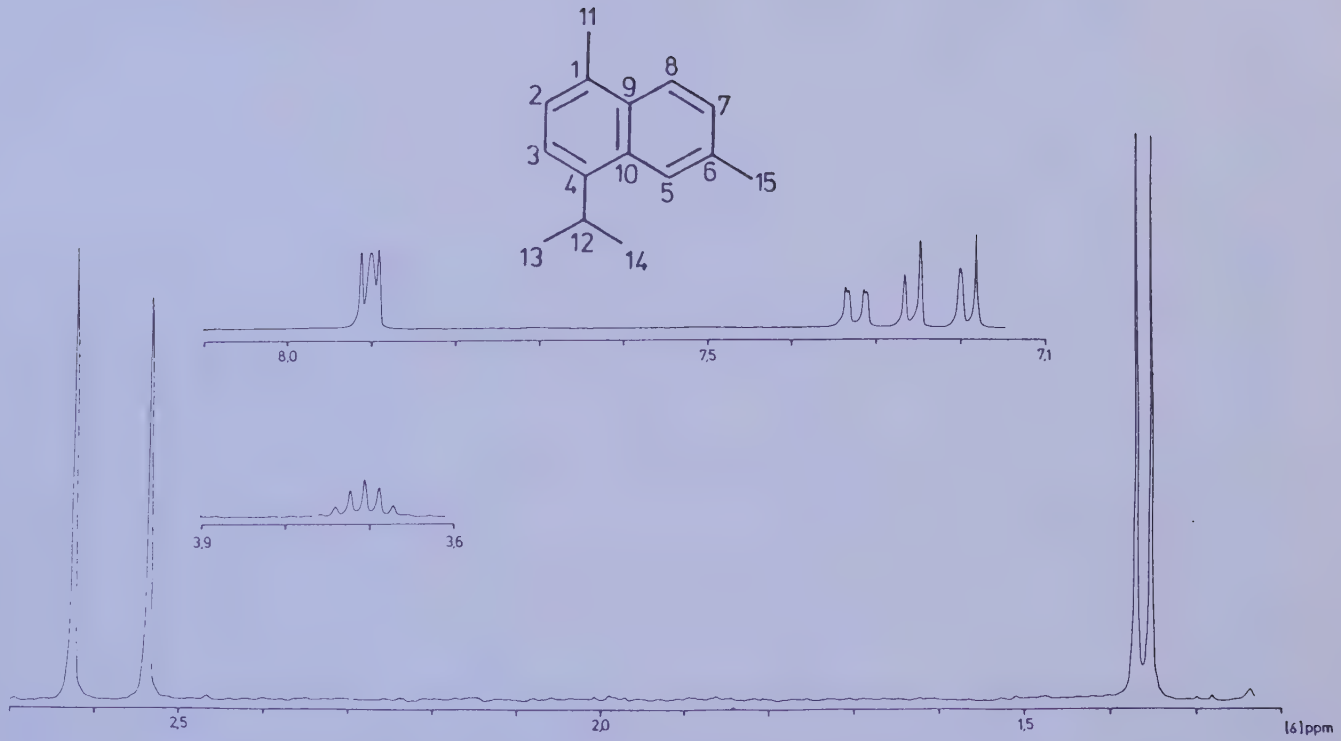


Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung I (Cadalin)

3.2.3.2. Identifizierung weiterer Terpenkohlenwasserstoffe durch GC- und GC/MS-Analyse

In der nach der sc Abtrennung von Cadalin erhaltenen Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion konnten gc an einer OV-101- bzw. an einer Carbowax 20 M-Kapillarsäule (System 2 bzw. 5) 31 Verbindungen nachgewiesen werden (Abb. 17). Aufgrund der Retentionszeiten handelt es sich bei den unter den gewählten Bedingungen mit einer Retentionszeit von unter fünf Minuten erscheinenden Verbindungen um Monoterpenkohlenwasserstoffe (Peak 1-9) und bei den zwischen 10 und 20 Minuten auftretenden Verbindungen um Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (Peak 10-31), die danach sowohl anzahlmäßig als auch mengenmäßig in der Fraktion überwiegen.

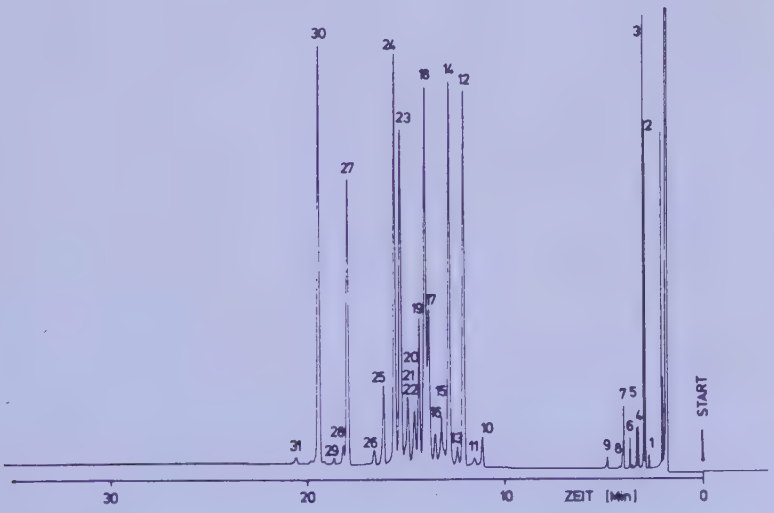


Abb. 17: Kapillargaschromatogramm der Kohlenwasserstoffe nach der Abtrennung von Cadalin (GC-System 2)

Für die Identifizierung einzelner Komponenten in komplex zusammengesetzten, präparativ schwer trennbaren Gemischen, wie sie u.a. in ätherischen Ölen oder in Einzelfraktionen ätherischer Öle vorliegen, ist heute die gc Analyse an Kapillarsäulen und die gekoppelte GC/MS-Analyse die Methode der Wahl [21,14]. Eine eindeutige Identifizierung einzelner Komponenten ist auf diesem Wege stets dann gegeben, wenn die authentischen Verbindungen zum Vergleich zur Verfügung stehen. Kann wegen fehlender Vergleichssubstanz die identische Retentionszeit nicht überprüft werden, lassen die erhaltenen Massenspektren (zukünftig MS abgekürzt) wegen möglicher Abweichungen in den relativen Intensitäten einzelner Spaltprodukte infolge nicht identischer Aufnahmebedingungen nicht in jedem Fall eine eindeutige Aussage zu. Das gilt insbesondere für isomere Verbindungen, die sich zwar gc differenzieren lassen, deren Massenspektren aber oft nur geringe Unterschiede in den Intensitäten einzelner Fragmente zeigen.

Von den gc nachgewiesenen Verbindungen konnten durch GC-Analyse an den beiden genannten Säulen und durch gekoppelte GC/MS-Analyse 14 Verbindungen identifiziert werden (s. Tab. 4). Mit Ausnahme von β-Phellandren, α-Bergamoten und Calacoren standen von den identifizierten Verbindungen authentische Vergleichssubstanzen zur Verfügung, mit denen die Übereinstimmung der Retentionszeiten jeweils durch Koinjektion bestätigt wurde, und von denen jeweils unter denselben Bedingungen die Massenspektren aufgenommen wurden. Diese waren jeweils identisch und stimmten darüberhinaus mit den in der Literatur für diese Verbindungen angegebenen Spektren überein. Das MS der in Peak 6 erscheinenden Verbindung war mit dem in der Literatur [14,27,32 33] angegebenen Spektrum für β-Phellandren identisch (s. Anhang

MS-Spektren, Abb. 51). Es unterscheidet sich vom α-Phellandren-Spektrum (s. Abb. 61) nur in den Intensitäten der Spaltprodukte bei m/z 77, 79 und 121, wobei die Intensitäten bei m/z 79 und 121 größer, die Intensität bei m/z 77 kleiner als bei α-Phellandren sind. Als Vergleichssubstanz stand α-Phellandren zur Verfügung, dessen Retentionszeit (System 2; 2,6 Min.) deutlich von der im Peak 6 erscheinenden Komponente (3,40 Min.) verschieden war, und dessen unter denselben Bedingungen aufgenommenes MS die erwähnten Unterschiede zu β-Phellandren zeigte. Durch Ausschluß von α-Phellandren ist somit das Vorliegen von β-Phellandren ausreichend gesichert.

Die Identifizierung von α-Bergamoten erfolgte ausschließlich über das Massenspektrum, dessen Fragmentierungsmuster einschließlich der Intensitätsverhältnisse mit dem Literatur- und Vergleichsspektrum von α-Bergamoten identisch war.

Die in Peak Nr. 24 (Hauptkomponente des Öls; s. Abb. 13; RT 14,88) und 25 erscheinenden Verbindungen zeigten ein fast identisches MS mit jeweils einem Molekülpeak bei m/z 200 und dem Basispeak bei m/z 157. Sie unterschieden sich nur in den Intensitäten der Fragmente bei m/z 156, 183 und 198. Das Spektrum der in Peak 24 vorliegenden Verbindung stimmte mit dem Vergleichsspektrum von α-Calacoren überein. Bei den beiden Verbindungen handelt es sich somit um zwei isomere Calacorene. Eine eindeutige Zuordnung zu den bekannten Isomeren α-, β- und γ-Calacoren kann aus den genannten Gründen aufgrund der Massenspektren nicht mit Sicherheit vorgenommen werden. Da keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, muß diese Entscheidung offen bleiben.

Bei der in Peak 30 vorliegenden Verbindung handelt es sich um nicht vollständig abgetrenntes Cadalin.

Tab. 4: Die Zusammensetzung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion (Abbildung der aufgenommenen Massenspektren s. Anh. S. 121)

Peak Nr.	Ret.Zeit (Min.) System 2	Ret.Zeit (Min.) System 5	Verbindung	Literatur MS-Angaben
1	2,50	-	unbekannt	
2	2,65	2,45	β-Pinen	14,25,32,33
3	2,73	2,93	Myrcen	14,25,31,32,33
4	3,00	4,65	p-Cymen	14,25,31,32
5	3,10	-	unbekannt	
6	3,40	-	β-Phellandren	14,27,32,33
7	3,68	8,30	α,p-Dimethylstyren	14,25
8	3,75	-	unbekannt	
9	4,50	-	unbekannt	
10	10,50	10,45	β-Bourbonen	
11	10,90	-	unbekannt	
12	11,43	12,65	β-Caryophyllen	23,31,34
13	11,75	-	unbekannt	
14	12,18	12,35	α-Bergamoten	24,29,34 *
15	12,55	-	M^+ 204	
16	12,90	-	unbekannt	
17	13,18	15,25	γ-Muurolen	
18	13,38	17,70	α-Curcumen	26,30 *
19	13,65	-	M^+ 204	
20	13,90	-	M^+ 204	
21	14,20	-	M^+ 204	
22	14,32	-	unbekannt	
23	14,60	17,25	δ-Cadinen	34
24	14,88	21,60	Calacoren	23 *
25	15,40	-	Calacoren	23 *
26	15,89	-	unbekannt	
27	17,15	-	M^+ 202	
28	17,38	-	unbekannt	
29	17,85	-	unbekannt	
30	18,60	29,35	Cadalin	
31	19,75	-	unbekannt	

* Herrn Prof. Dr. K.-H. Kubeczka, Institut für Pharmazeutische Biologie Universität Würzburg, danke ich für die MS von α-Bergamoten und α-Curcumen und Herrn Dr. Brunke, Fa. Dragoco Holzminden, für die MS von α-Bergamoten und α-Calacoren.

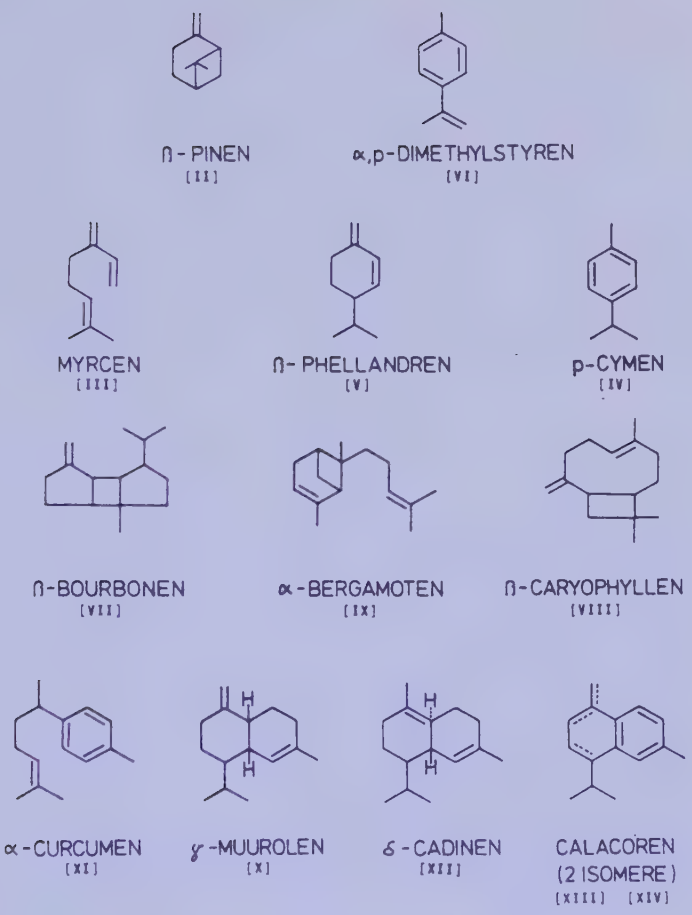


Abb. 18: Strukturformeln der identifizierten Terpenkohlenwasserstoffe

3.2.3.3. Identifizierung einiger Terpenkohlenwasserstoffe des ätherischen Öles der Blüten von Arnica montana

Da die Terpenkohlenwasserstoffe des ätherischen Öles der Blüten von Arnica montana bisher nur unzureichend identifiziert worden sind, wurden diese aus dem ätherischen Blütenöl abgetrennt (s. Kap. 7.13.2) und analog wie bei Heterotheca inuloides gc sowie durch gekoppelte GC/MS-Analyse untersucht. Abb. 19 zeigt die Zusammensetzung der Kohlenwasserstoff-Fraktion. Sie ist besonders im Bereich der Monoterpene (Retentionszeit bis 5 Minuten) sehr viel komponentenreicher als bei Heterotheca inuloides (s. Abb. 17).

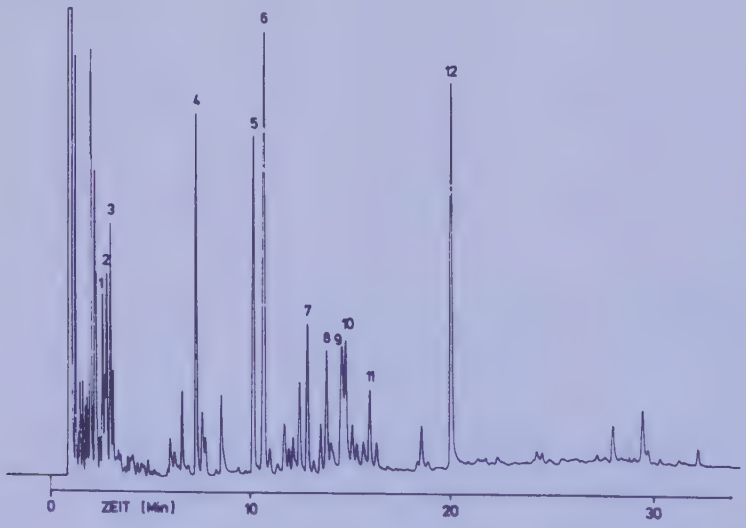


Abb. 19: Kapillargaschromatogramm der Kohlenwasserstoff-Fraktion aus dem ätherischen Öl der Blüten von Arnica montana (GC-System 2)

Die identifizierten Verbindungen sind in Tab. 5 aufgeführt. Für trans-β-Farnesen stand keine Vergleichssubstanz zur Verfügung. Die Identifizierung beruht deshalb nur auf dem MS,

Tab. 5: Die Zusammensetzung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion von Arnica montana

Peak Nr.	Ret. Zeit (Min.) System 2	Ret. Zeit (Min.) System 5	Verbindung	Literatur MS-Angaben*
1	2,52	3,15	α-Phellandren	14,25,27,32,33
2	2,73	2,93	Myrcen	14,25,31,32,33
3	2,90	4,65	p-Cymen	14,25,31,32
4	7,12	12,40	Thymolmethylether	
5	10,03	-	M^+ 204	
6	10,50	-	M^+ 204	
7	12,78	-	trans-β-Farnesen	27,28,34
8	13,75	14,70	Humulen	23
9	14,50	-	M^+ 204	
10	14,70	16,05	α-Muurolen	
11	15,90	17,25	δ-Cadinen	34
12	19,85	28,20	Thymol	

*Abbildungen der aufgenommenen Massenspektren s. Anhang S. 121

das dem Literaturspektrum entspricht [27,28,34]. Die Identität der übrigen Verbindungen wurde durch Vergleich mit authentischen Substanzen abgesichert. In Peak Nr. 4 erscheint in der Kohlenwasserstoff-Fraktion Thymolmethylether, der sich aufgrund seiner Polarität bei der Abtrennung der sauerstoffhaltigen Komponenten nicht von den Kohlenwasserstoffen trennen läßt. Das in Peak 12 auftretende Thymol ist ein Artefakt des Thymolmethylethers, da es von seiner Polarität her nicht in die Kohlenwasserstoff-Fraktion gelangt. Bei längerer Lagerung der Fraktion im Tiefkühlschrank nimmt die Intensität des Peaks von Thymolmethylether ab, die des Thymols dagegen zu. Von den identifizierten Terpenkohlenwasserstoffen sind p-Cymen, Myrcen, α-Phellandren, trans-β-Farnesen, Humulen

und δ-Cadinen bisher noch nicht als Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana bzw. ihres ätherischen Öles beschrieben worden.

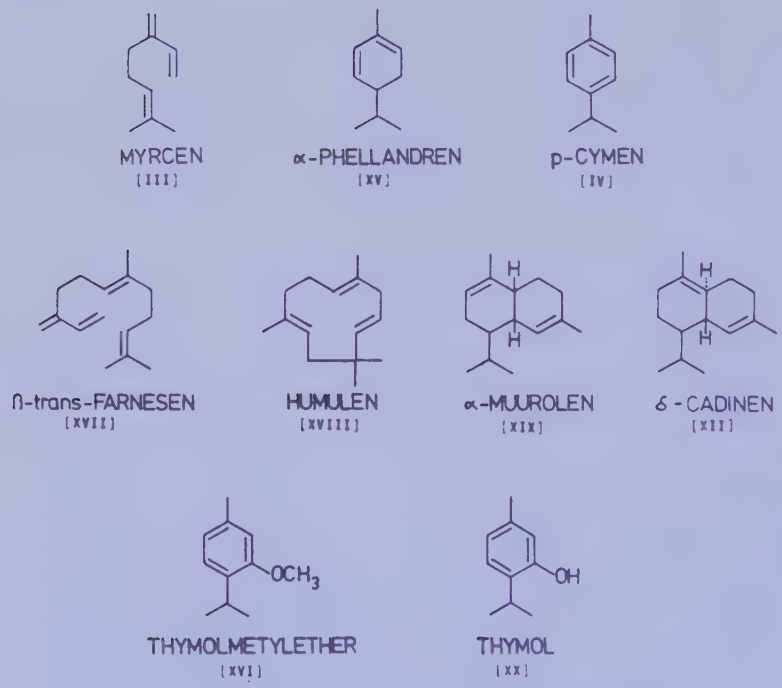
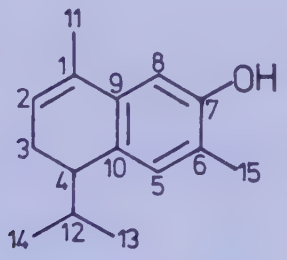


Abb. 20: Strukturformeln der identifizierten Verbindungen aus Arnica montana

3.2.4. Zur Zusammensetzung der Fraktion der sauerstoffhaltigen Komponenten

3.2.4.1. Isolierung und Identifizierung von 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin (Verbindungen XXI und XXII)

Zur Isolierung der Hauptkomponenten der Fraktion der sauerstoffhaltigen Verbindungen des ätherischen Öles wurde diese Fraktion sc aufgetrennt (s. Exp. Teil, S. 110). Die gc und dc Oberprüfung der hierbei erhaltenen Teilfraktion O/3 (s. Tab. 16, S. 111) ergab, daß hier zwei Verbindungen angereichert vorlagen, von denen eine eine weitere Hauptkomponente des ätherischen Öles darstellte. Mit Echtblau B-Lösung reagierten beide Verbindungen auf der DC-Platte unter Blau-Violettfärbung, was auf das Vorliegen von phenolischen Verbindungen hindeutete. Sie wurden aus der Fraktion in Mengen von 10 mg (Verbindung XXI) bzw. 4,5 mg (Verbindung XXII) isoliert.



7-HYDROXY-3,4-DIHYDROCADALIN [XXI]

Verbindung XXI lag nach Umkristallisation aus Petrolether in Form von farblosen Kristallnadeln vor, die im Bereich von 102-103° C schmolzen. Im Massenspektrum (Abb. 21) zeigt die Substanz einen Molekülpeak bei m/z 216. Der Basispeak bei

m/z 173 [M^+- C_3H_7] deutete auf die Abspaltung einer Isopropylgruppe hin, die Folgefragmente bei m/z 158 [M^+- C_3H_7 - CH_3] und m/z 155 [M^+- C_3H_7 - H_2O] auf die weitere Abspaltung einer Methylgruppe und auf die Eliminierung einer OH-Gruppe in Form von Wasser. Das IR-Spektrum (Abb. 22) zeigt die Absorption für eine OH-Gruppe, deren Lage bei 3605 cm^{-1} in Tetrachlorkohlenstoff auf eine phenolische OH-Gruppe hinweist. Desweiteren treten Signale für einen Aromaten bei 1620, 1585 und 1505 cm^{-1} sowie für eine Isopropylgruppe bei 1380 und 1360 cm^{-1} auf.

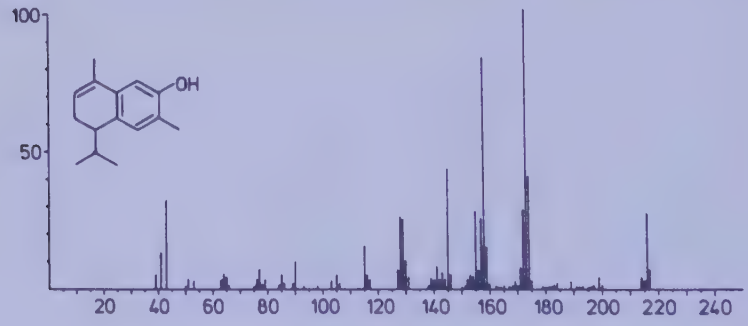


Abb. 21: Massenspektrum von Verbindung XXI
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

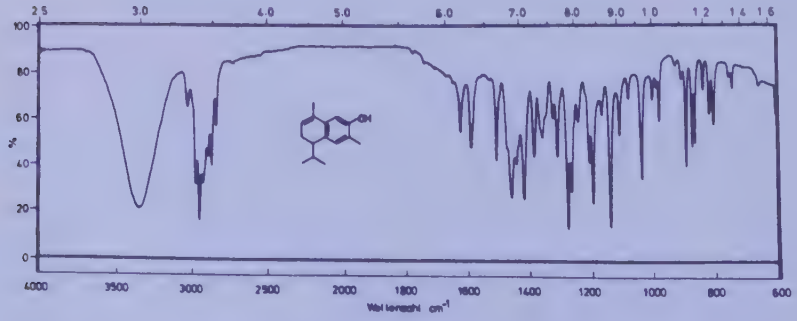


Abb. 22: IR-Spektrum von Verbindung XXI (in KBr)

Schmelzpunkt, Massenspektrum und IR-Spektrum deuteten darauf hin, daß es sich bei Verbindung XXI um das von Bohlmann und Zdero [13] aus dem Kraut von Heterotheca ihuloides isolierte 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin handelte. Den endgültigen Beweis lieferte das NMR-Spektrum (Abb. 23; Tab. 6). Die chemische Verschiebung und die Multiplizitäten entsprachen den von Bohlmann und Zdero [13] angegebenen Werten für 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin.

Tab. 6: ^{1}H-NMR-Daten von Verbindung XXI (7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin)/(400 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; innerer Standard: TMS)

	Verbindung XXI	Literaturwerte[1)]
Protonen	δ (ppm) Multiplizität	δ (ppm) Multiplizität
H-2	5,66 m	5,71 m
H-3α, H-3β, H-4	2,31 m	2,38 m
H-5	6,85 s	6,89 s
H-8	6,65 s	6,72 s
CH_3 an C-1	1,98 m	1,99 dt
H-12	1,83 m	1,88 dqq
CH_3 an C-12	0,88 d	0,89 d
CH_3'an C-12	0,80 d	0,82 d
CH_3 an C-6	2,23 s	2,28 s
OH-7	4,51 s (br)	

1) Bohlmann u. Zdero [13]

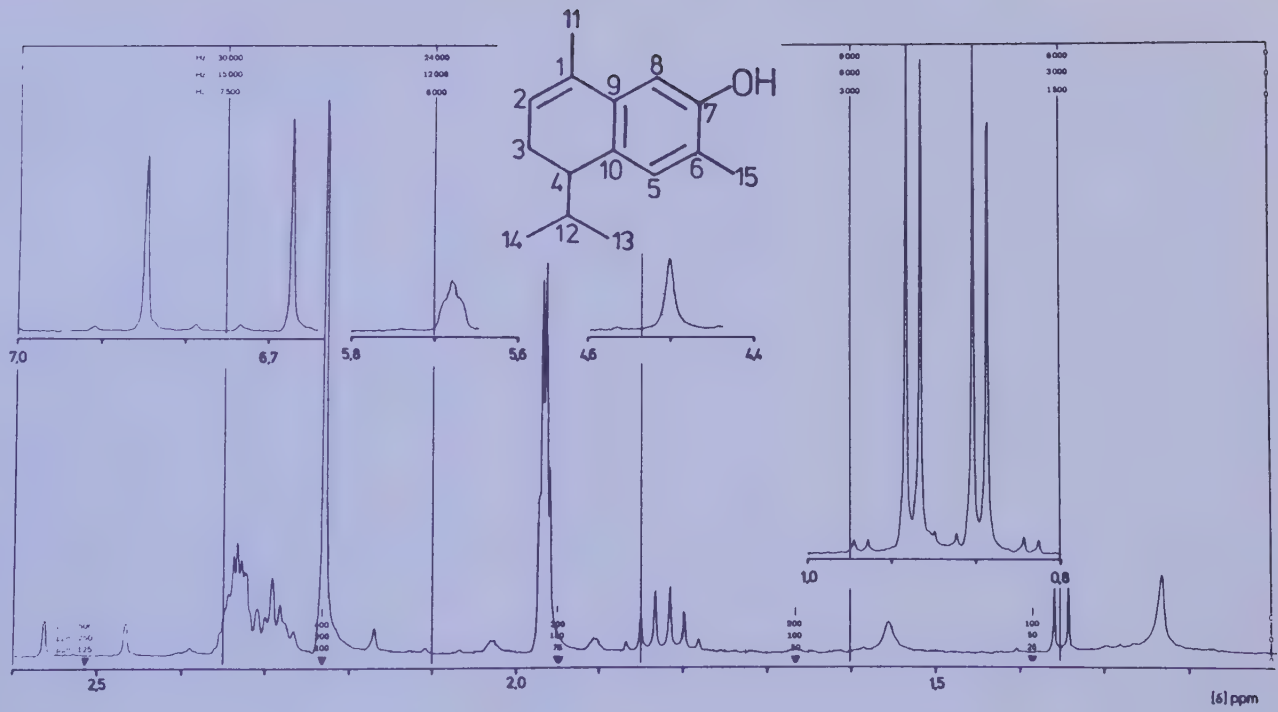
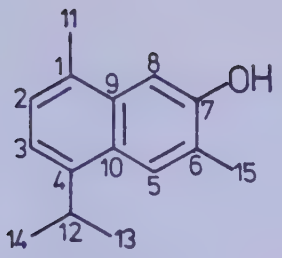


Abb. 23: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung XXI (7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin)



7-HYDROXYCADALIN [XXII]

Verbindung XXII lag nach Umkristallisation aus Petrolether ebenfalls in Form von farblosen Kristallnadeln vor. Ihr Schmelzpunkt betrug 118-119° C. Das Massenspektrum (Abb. 24) zeigt einen relativ intensiven Molekülpeak bei m/z 214 und den Basispeak bei m/z 199 [M^+- CH_3]. Andere Folgefragmente bei m/z 184 [M^+- 15 - 15] und 171 [M^+- 43] resultieren aus der Abspaltung einer weiteren Methylgruppe bzw. einer Isopropylgruppe. Im IR-Spektrum (Abb. 25) erscheint das Signal einer phenolischen OH-Gruppe bei 3600 cm^{-1} (in Tetrachlorkohlenstoff) sowie eine starke und breite Bande der C-O-Streckschwingung bei 1240 cm^{-1} [35]. Desweiteren treten

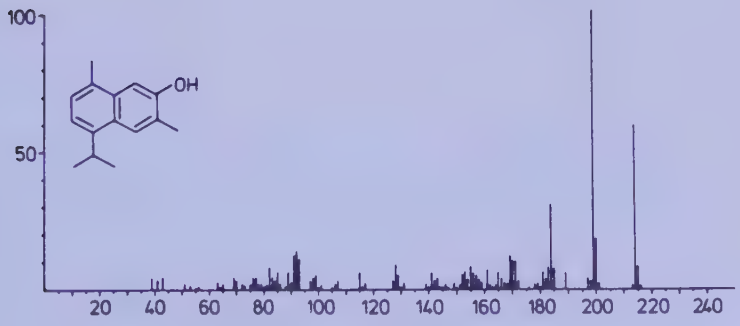


Abb. 24: Massenspektrum von Verbindung XXII
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

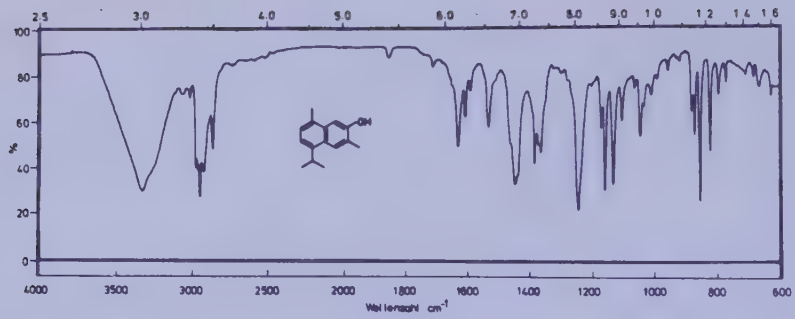


Abb. 25: IR-Spektrum (KBr) von Verbindung XXII

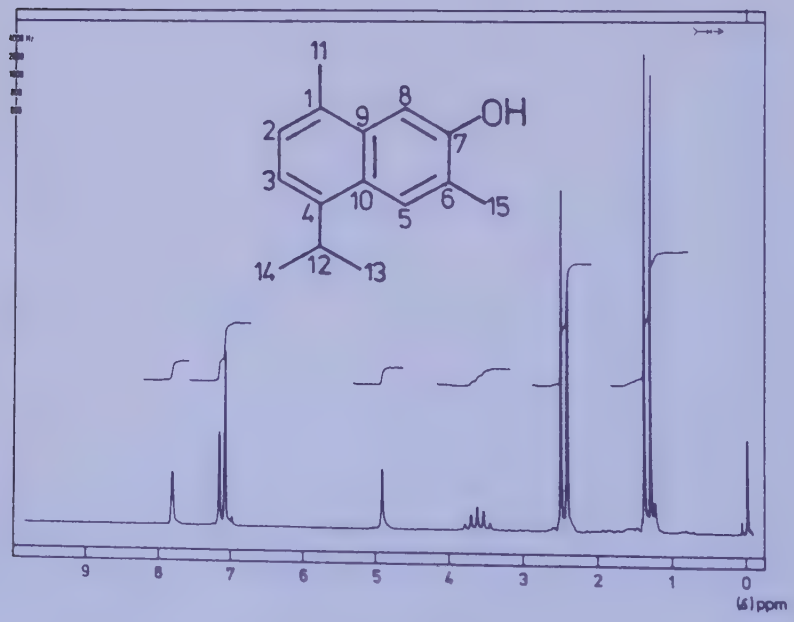


Abb. 26: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung XXII (7-Hydroxy-cadalin)

Banden für eine aromatische Struktur bei 1628, 1605 und 1530 cm^{-1} auf, sowie Banden für eine Isopropylgruppe bei 1380 und 1360 cm^{-1}.

Tab. 7: ^{1}H-NMR-Verschiebungen und Multiplizitäten von Verbindung XXII (7-Hydroxycadalin) (80 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; innerer Standard: TMS)

	Verbindung XXII	Literaturwerte[1)]
Protonen	δ (ppm) Multiplizität	δ (ppm) Multiplizität
H-2	7,15 s	7,15 s
H-3	7,15 s	7,15 s
H-5	7,88 s (br)	7,89 s (br)
H-8	7,23 s	7,25 s
CH_3 an C-1	2,54 s	2,53 s
H-12	3,66 m	3,67 m
CH_3 an C-12	1,36 d	1,36 d
CH_3 an C-12		
CH_3 an C-6	2,45 s	2,45 s
OH-7	4,96 s (br)	5,06 s (br)

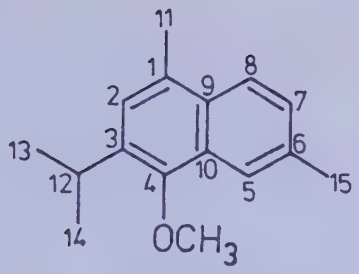
1) Fracheboud et al. [37]

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 26) zeigt, daß es sich bei Verbindung XXII um ein Cadalinderivat handelt. Die Signale für die an den aromatischen Ringen stehenden beiden Methylgruppen erscheinen als Singuletts bei 2,54 und 2,45 ppm. Ein Dublett für 6 Protonen (J = 7 Hz) ist den beiden Methylgruppen der Isopropylgruppe zuzuordnen. Das Signal für das mit den Methyl-

gruppen koppelnde Methinproton erscheint als Multiplett (qq) bei 3,66 ppm. Im Bereich der chemischen Verschiebung von Protonen phenolischer OH-Gruppen findet sich ein breites Singulett (1 Proton) bei 4,96 ppm. Im Resonanzbereich der aromatischen Protonen liegen die Absorptionen für vier Protonen: ein Singulett für 2 Protonen bei 7,15 ppm, ein Singulett bei 7,23 ppm (1 Proton) und ein breites Singulett bei 7,88 ppm (1 Proton). Aus dem Vergleich mit den ^{1}H-NMR-Daten von Cadalin (Verbindung I; s. Tab. 3, S. 25) geht hervor, daß es sich bei Verbindung XXII um 7-Hydroxycadalin handeln muß, das als Naturstoff bereits beschrieben worden ist [36,37,38,39,40]. Die spektroskopischen Daten von Verbindung XXII stimmen mit den dort für 7-Hydroxycadalin angegebenen Daten überein (s. auch Tab. 7).

3.2.4.2. Isolierung und Identifizierung von 4-Methoxyisocadalin (Verbindung XXIII)

In der Teilfraktion O/2 der sauerstoffhaltigen Komponenten (s. Exp. Teil, Tab. 16, S. 111) stellte eine Verbindung die Hauptkomponente. Sie war sehr lipophil, da sie bei der Trennung des Öles in die Fraktion der sauerstoffhaltigen und der sauerstofffreien Bestandteile gleichzeitig auch in letzterer auftrat (s. Abb. 13, S. 21, RT: 22,55 Min.). Die Hauptmenge lag jedoch in der Fraktion der sauerstoffhaltigen Komponenten vor. Die Verbindung wurde hieraus durch präparative HPLC (System 1) isoliert. Danach lagen 45 mg einer öligen, dc und gc reinen Substanz vor. Nach längerem Stehenlassen im Tiefkühlschrank kristallisierte sie in plättchenförmigen Kristallen (Smp.: 71-72^{o} C).



4-METHOXYISOCADALIN [XXIII]

Das Massenspektrum (Abb. 27) zeigt einen Molekülpeak bei m/z 228, der den Basispeak bildet. Das erste Folgefragment bei m/z 213 [M^+- 15] resultiert aus der Abspaltung einer Methylgruppe. Das Fragment bei m/z 198 [M^+- 30] deutet auf das Vorliegen eines aromatischen Methylethers hin [M^+- CH_2O] und/oder auf die Abspaltung einer weiteren Methylgruppe [M^+- 15 - 15]. Charakteristische Spaltprodukte finden sich desweiteren bei m/z 185 und 184 [M^+- 43] bzw. [M^+- 44], die als Ab-

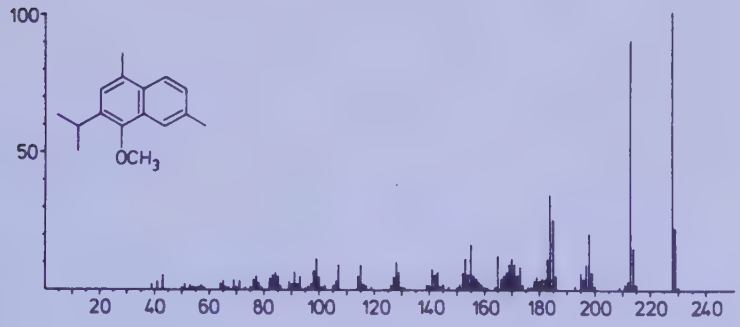


Abb. 27: Massenspektrum von Verbindung XXIII
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

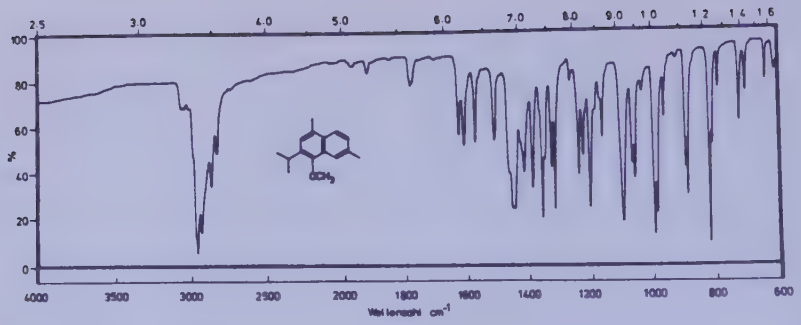


Abb. 28: IR-Spektrum (KBr) von Verbindung XXIII

spaltung von C_3H_7- bzw. C_3H_8-Fragmenten gedeutet werden können. Im Einklang mit dem Massenspektrum zeigt das IR-Spektrum (Abb. 28) neben Aromaten-Banden bei 1620, 1605, 1570 und 1508 cm^{-1} die CH-Valenzschwingung eines Arylethers bei 2825 cm^{-1} und die Bande für einen Ether bei 1095 cm^{-1}.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 29) erscheinen die Signale für die beiden Methylgruppen der Isopropylgruppe als Dublett bei 1,285 ppm (J = 7 Hz) und für das mit ihnen koppelnde Methinproton als Multiplett bei 3,557 ppm (J = 7 Hz). Zwei Singuletts für jeweils 3 Protonen bei 2,613 und 2,427 ppm sind von der Lage her zwei an einem Aromaten lokalisierten Methylgruppen zuzuordnen. Ein weiteres Singulett bei 3,892 ppm (3 Protonen) liegt im Bereich der chemischen Verschiebung einer an einem Aromaten lokalisierten Methoxygruppe. Im Resonanzbereich der aromatischen Protonen erscheinen Signale für vier Protonen. Insgesamt belegen die Signale des ^{1}H-NMR-Spektrums in Verbindung mit den Daten des Massen- und IR-Spektrums das Vorliegen eines Methoxycadalins oder Methoxyisocadalins. Die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungs-

muster von drei der vier aromatischen Protonen entsprechen denen von Cadalin (Verbindung I, s. Tab. 3, S. 25) und sind den Protonen H-5 (7,853 ppm, s (br)), H-7 (7,283 ppm, dd) sowie H-8 (7,800 ppm, d) zuzuordnen. Das vierte Proton liefert ein Singulett bei 7,125 ppm (H-2). Das Dublett der Isopropylgruppe bei 1,285 ppm ist im Vergleich zum Cadalin (1,37 ppm) etwas ins Hochfeld verschoben und entspricht in seiner Lage dem von 4-Methoxyisocadalin, das von Bohlmann u. Zdero [13] aus dem Kraut von Heterotheca inuloides isoliert worden ist. Sowohl die ^{1}H-NMR-Signale (s. Tab. 8) als auch die angegebenen Daten des MS- und IR-Spektrums stimmen mit denen der isolierten Verbindung XXIII überein. 4-Methoxyisocadalin ist somit auch Bestandteil des ätherischen Öles der Blütendroge.

Ein Doppelresonanzexperiment zeigte, daß die von Bohlmann u. Zdero [13] getroffene Zuordnung der Signale für die beiden ringständigen Methylgruppen an C-1 und C-6 zu vertauschen sind. Bei Einstrahlung auf das Signal von H-5 bei 7,853 ppm tritt die Fernkopplung mit dem Signal der Methylgruppe bei 2,527 ppm nicht mehr auf, so daß dieses Signal der Methylgruppe an C-6 zuzuordnen ist. Gestützt wird diese Zuordnung auch durch die chemischen Verschiebungen der Methylgruppen von 1-Methyl- und 2-Methylnaphthalin, bei denen das Signal für die Methylgruppe an C-2 (2,46 ppm) im Vergleich zu dem für die Methylgruppe an C-1 (2,65 ppm) ebenfalls im hohen Feld auftritt [43,44].

Tab. 8: ^{1}H-NMR-Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten von Verbindung XXIII (360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; innerer Standard: TMS; s: Singulett; d: Dublett; q: Quartett; m: Multiplett)

	Verbindung XXIII			Literaturwerte[1)]		
Protonen	δ (ppm)	J	Hz	δ (ppm)	J	Hz
H-2	7,125 s			7,04 s		
H-5	7,853 s (br)	5/7	1,9	7,79 s (br)	5/7	1,5
H-7	7,283 dd	7/8	8,5	7,19 dd	7/8	8,5
H-8	7,800 d			7,73 d		
CH_3 an C-1	2,613 s			2,52 s		
H-12	3,557 m			3,52 m		
CH_3 an C-12	1,285 d	12/13	7	1,25 d	12/13	7
CH_3'an C-12		12/14			12/14	
CH_3 an C-6	2,527 s			2,59 s		
OCH_3	3,892 s			3,84 s		

1) Bohlmann u. Zdero [13]

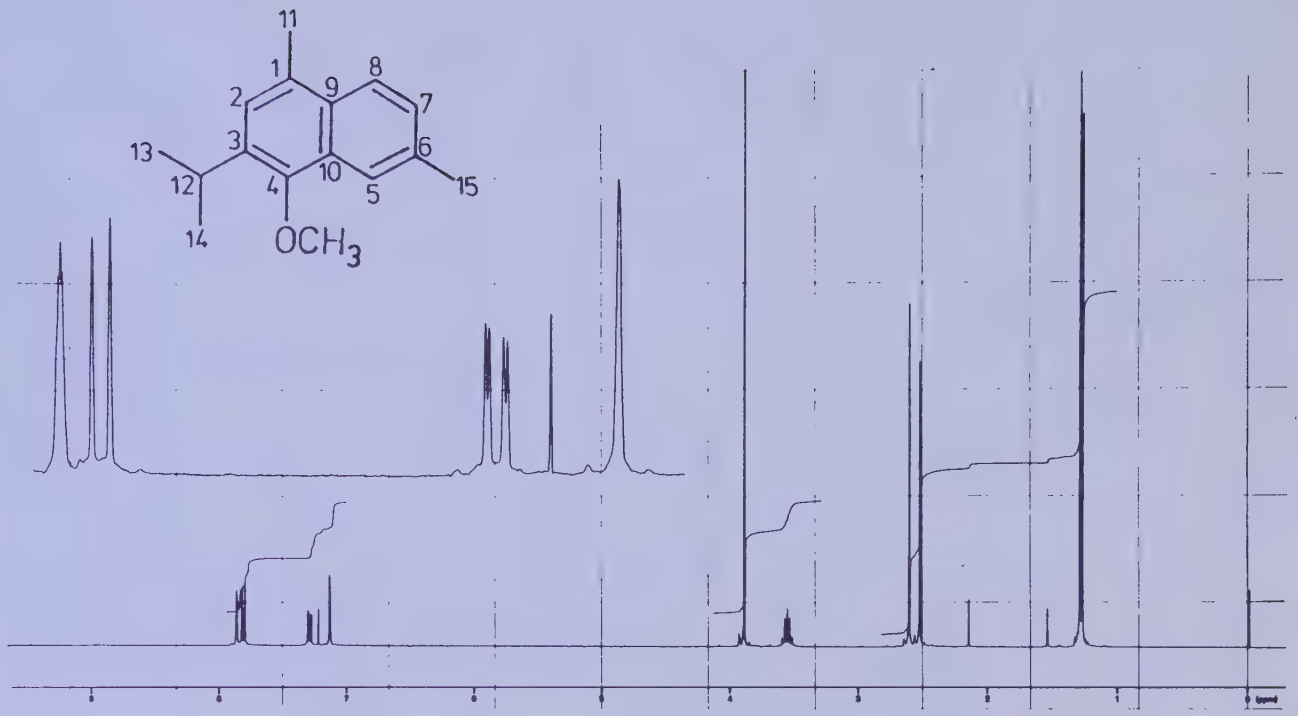


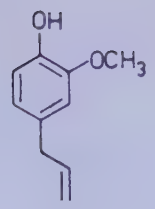
Abb. 29: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung XXIII (4-Methoxyisocadalin)

3.2.4.3. Identifizierung weiterer Komponenten durch GC- und GC/MS-Analyse

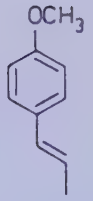
Zur Identifizierung weiterer Komponenten wurden die nach sc Auftrennung der Fraktion der sauerstoffhaltigen Verbindungen des ätherischen Öles erhaltenen Teilfraktionen O/1 bis O/6 (s. Exp. Teil, Tab. 16, S. 111) einer GC-Analyse an einer OV-101- und einer CW-20M-Kapillarsäule sowie einer gekoppelten GC/MS-Analyse unterworfen. In Tab. 9 sind die auf diesem Wege identifizierten Verbindungen aufgeführt (Strukturformeln s. Abb. 30). Mit Ausnahme von 1-p-Menthen-9-al (Verbindung XXX) standen für alle nachgewiesenen Verbindungen authentische Vergleichssubstanzen zur Verfügung. Bei 1-p-Menthen-9-al erfolgte die Identifizierung nur durch das MS, das mit dem Literaturspektrum [42] völlig übereinstimmte. Von den identi-

Tab. 9: In der Fraktion der sauerstoffhaltigen Komponenten nachgewiesene Verbindungen

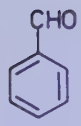
Verbindung	Retentionszeit (Min)		Literatur MS-Angaben
	System 2	System 5	
Benzaldehyd (XXIV)	2,60	10,50	21
Benzylalkohol (XXV)	2,80	20,25	21
Linalool (XXVI)	4,08	11,15	45,48
Menthon (XXVII)	4,78	8,90	46,49
Borneol (XXVIII)	5,30	15,50	45
α-Terpineol (XXIX)	5,55	15,30	26,31,45
1-p-Menthen-9-al (XXX)	5,90	-	42
Carvon (XXXI)	6,43	16,35	46
Anethol (XXXII)	7,50	19,00	21
Bornylacetat (XXXIII)	7,65	12,10	31,47
Eugenol (XXXIV)	8,08	27,90	21
Caryophyllenoxid (XXXV)	16,00	23,15	50



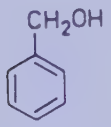
EUGENOL
[XXXIV]



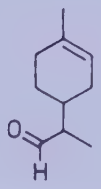
ANETHOL
[XXXII]



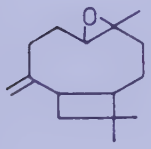
BENZALDEHYD
[XXIV]



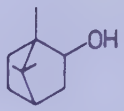
BENZYLALKOHOL
[XXV]



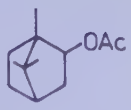
1-P-MENTHEN-9-AL
[XXX]



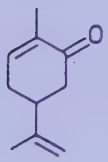
CARYOPHYLLENOXID
[XXXV]



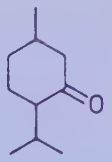
BORNEOL
[XXVIII]



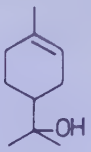
BORNYLACETAT
[XXXIII]



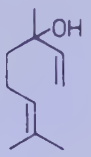
CARVON
[XXXI]



MENTHON
[XXVII]



α-TERPINEOL
[XXIX]



LINALOOL
[XXVI]

Abb. 30: Strukturformeln der durch GC- und GC/MS-Analyse nachgewiesenen sauerstoffhaltigen Komponenten des ätherischen Öles

fizierten Verbindungen ist Caryophyllenoxid eine weitere Hauptkomponente des ätherischen Öles (s. Abb. 32, S. 54). Die anderen Substanzen sind dagegen nur in geringer Konzentration im ätherischen Öl enthalten. Insgesamt lassen sich über 70 sauerstoffhaltige Verbindungen durch GC nachweisen.

3.2.4.4. Identifizierung von im ätherischen Öl auftretenden Fettsäuren

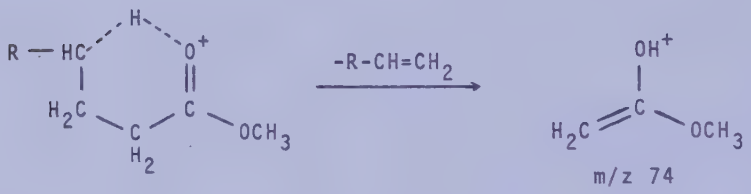
Da bei der erfolgten Aufarbeitung im ätherischen Öl keine Säuren nachgewiesen wurden, dieses jedoch aufgrund der Säurezahl von 20-21 (s. Tab. 2, S. 19) saure Bestandteile enthalten mußte, lag die Vermutung nahe, daß es sich hierbei wie im Arnikablütenöl um Fettsäuren handeln könnte. Aus diesem Grund wurden 4,0 g ätherisches Öl in n-Pentan gelöst und mit verdünnter Na_2CO_3-Lösung ausgeschüttelt. Hierbei fielen 0,714 g einer Fettsäurefraktion an (= 17,85 % des ätherischen Öles). Nach Methylierung mit Diazomethan und sc Reinigung der Fettsäuremethylester (FSME) an Kieselgel wurde das Estergemisch an einer OV-101-Kapillarsäule gc aufgetrennt. Neben Palmitinsäure als Hauptkomponente wurden sechs weitere, im Vergleich dazu nur in Spuren auftretende Fettsäuren nachgewiesen (s. Abb. 31 und Tab. 10). Ihre Identifizierung erfolgte durch Koinjektion der authentischen Fettsäuremethylester und durch eine gekoppelte GC/MS-Analyse.
Fettsäuren und ihre Methylester zeigen im Massenspektrum ein charakteristisches Fragmentierungsmuster, anhand dessen sie sich leicht und eindeutig identifizieren lassen [51,52,53]. Sie zeigen allgemein einen Molekülpeak. Bei den Methylestern

Abb. 31: Kapillargaschromatogramm der methylierten Fettsäuren

Tab. 10: Die Zusammensetzung der aus dem ätherischen Öl abgetrennten Fettsäuren (17,85 % des ätherischen Öles)

Peak Nr. (s. Abb. 31)	Fettsäuremethylester	Ret. Zeit (Min.) System 4
1	Myristinsäure	8,60
2	Pentadecansäure	9,85
3	Palmitoleinsäure	10,70
4	Palmitinsäure	11,00
5	Linolsäure	12,70
6	Ölsäure	12,80
7	Stearinsäure	13,10

tritt als Folgefragment mit geringer Intensität das Spaltprodukt $M^+ - 31$ auf, das durch die Abspaltung der Methoxygruppe entsteht. Basispeak der gesättigten höheren FSME ist das Fragment m/z 74, das aus einer McLafferty-Umlagerung hervorgeht.



m/z 74

Charakteristische Spaltprodukte sind weiterhin $[(CH_2)_nCOOCH_3]$-Fragmente mit jeweils einer Massendifferenz von 14 (CH_2).

3.3. Übersicht über die Zusammensetzung des ätherischen Öles

Aufgrund der durchgeführten präparativen Auftrennung des ätherischen Öles besteht dieses zu etwa 18 % aus Fettsäuren, 8 % Phenolen, 26 % Terpenkohlenwasserstoffen und 43 % anderen, sauerstoffhaltigen Komponenten (s. Kap. 7.8., S. 110). Der Fettsäureanteil wird überwiegend von der Palmitinsäure gebildet. Bei den Phenolen handelt es sich hauptsächlich um 7-Hydroxycadalin und 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin, das zu den Hauptkomponenten des ätherischen Öles zu zählen ist. Zwei weitere Hauptkomponenten des Öles sind Cadalin und Calacoren, die beiden wesentlichen Verbindungen der Terpenkohlenwasserstofffraktion. Von den sauerstoffhaltigen Verbindungen sind 4-Methoxyisocadalin und Caryophyllenoxid, das neben Cadalin die zweitgrößte Komponente des Öles ist, weitere Hauptbestandteile des Öles. Neben den genannten Hauptkomponenten wurden 23 weitere Verbindungen im ätherischen Öl identifiziert (s. Abb. 32). Unter Berücksichtigung der im Gaschromatogramm nicht zugeordneten Fettsäuren beträgt der Anteil der identifizierten Verbindungen an der Gesamtzusammensetzung des ätherischen Öles etwa 70 %.

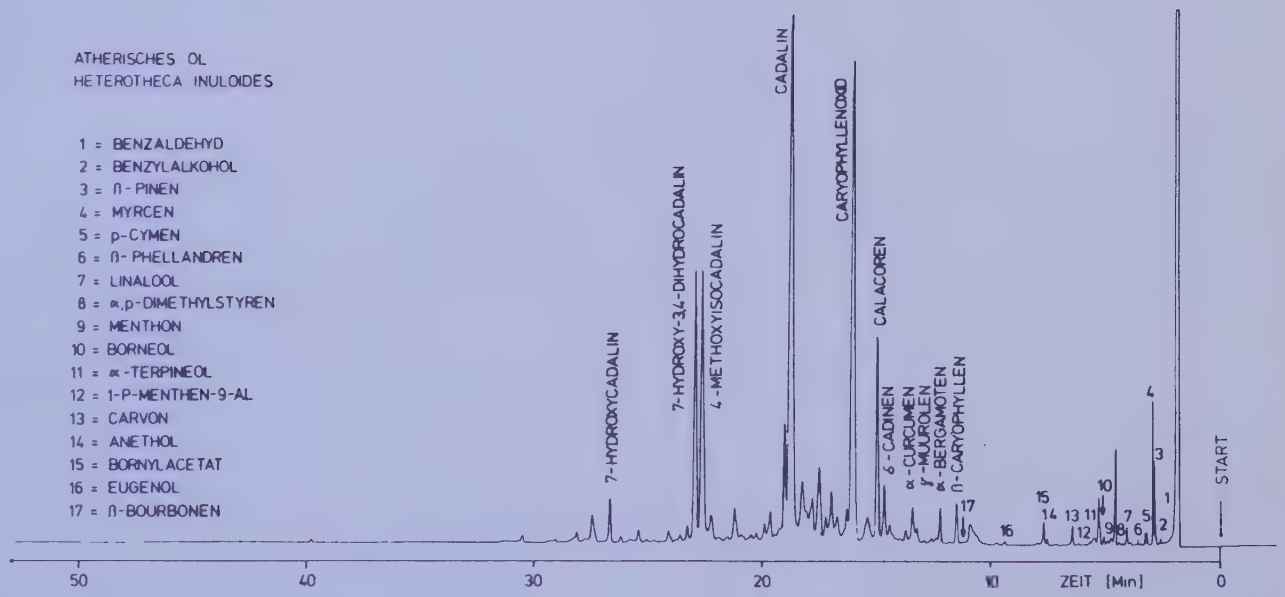


Abb. 32: Kapillargaschromatogramm (GC-System 2) des ätherischen Öles mit Zuordnung der identifizierten Verbindungen

4. Die Zusammensetzung des Petroletherextraktes

4.1. Fraktionierung des Petroletherextraktes

Aus 2,5 kg getrockneten und gemahlenen Blüten wurden die lipophilen Inhaltsstoffe durch Extraktion mit Petrolether gewonnen (3,61 % vom Blütentrockengewicht).
Die DC-Auftrennung des Extraktes zeigte, daß dieser sehr komplex zusammengesetzt ist (s. Abb. 33). Durch Cochromatographie der aus dem ätherischen Öl isolierten bzw. identifizierten lipophilen Verbindungen konnten einzelne Substanzzonen die-

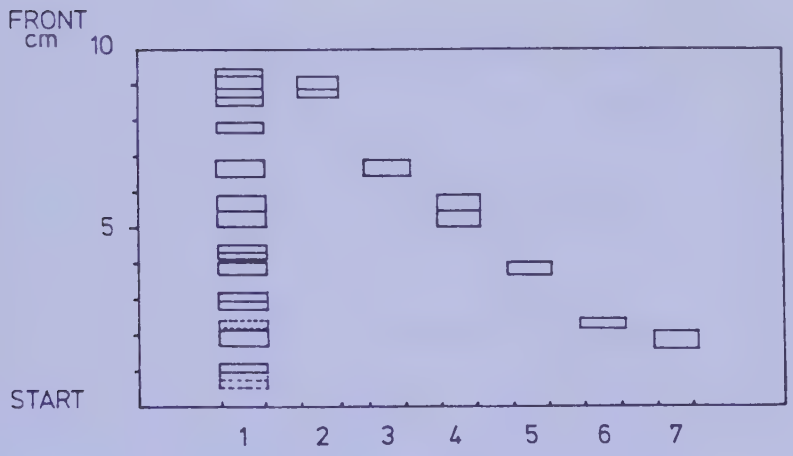


Abb. 33: DC des Petroletherextraktes (1) in System 1 nach Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure
2: Cadalin und 4-Methoxyisocadalin
3: Caryophyllenoxid
4: 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin
5: β-Amyrin
6: Cholesterin
7: Δ7-Steringemisch

sen zugeordnet werden (Cadalin, 4-Methoxyisocadalin, Caryophyllenoxid, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin; s. Abb. 33). Aufgrund von Laufhöhe und Farbreaktion mit Molybdatophosphorsäure-Reagenz waren weitere Komponenten als Triterpene sowie als Δ5- und Δ7-Sterine anzusprechen. Zur Identifizierung dieser Verbindungen wurde der Petroletherextrakt an Kieselgel unter schrittweiser Polarisierung des Elutionsmittels sc aufgetrennt (s. Exp. Teil, Tab. 17, S. 115).

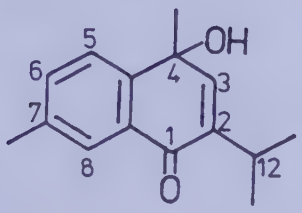
4.2. Isolierung der bereits im ätherischen Öl identifizierten Verbindungen I, XXI und XXII aus dem Petroletherextrakt (Cadalin, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin)

Aus den nach sc Auftrennung des Petroletherextraktes erhaltenen Teilfraktionen A 2 und A 4 (s. Tab. 17, S. 115) wurden nach weiterer sc bzw. HPLC-Trennung drei Verbindungen in Mengen von 53, 42 und 12,5 mg gc rein isoliert. Die IR- und ^{1}H-NMR- spektroskopische Analyse ergab, daß es sich bei ihnen um die bereits aus dem ätherischen Öl isolierten Verbindungen Cadalin (I), 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (XXI) und 7-Hydroxycadalin (XXII) handelte.

4.3. Isolierung und Identifizierung von 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon (Verbindung XXXVI)

Bei der weiteren sc Auftrennung der Fraktion A 7 (s. Tab. 17, S. 115), in der u.a. die Triterpene vorlagen, fiel eine Teilfraktion an, in der eine Komponente dominierte (GC-Analyse). Diese konnte durch präparative HPLC isoliert werden. Danach lagen 35 mg einer dc und gc reinen, farblosen öligen Substanz

vor, die nach langem Stehen im Tiefkühlschrank kristallisierte (Smp. 74-75° C).



4-HYDROXY-2-ISOPROPYL-
4,7-DIMETHYL-1(4H)-NAPHTHALINON [XXXVI]

Das Massenspektrum der Verbindung XXXVI (Abb. 34) zeigte einen Molekülpeak bei m/z 230. Das erste Folgefragment bei m/z 215 resultiert aus der Abspaltung einer Methylgruppe [M^+- 15]. Das Spaltprodukt bei m/z 212 spricht für die Eliminierung einer OH-Gruppe in Form von Wasser [M^+- 18]. Weitere Fragmente bei m/z 197 und 187 könnten durch die Abspaltung von Wasser bzw. CO aus dem ersten Folgefragment bei m/z 212 hervor-

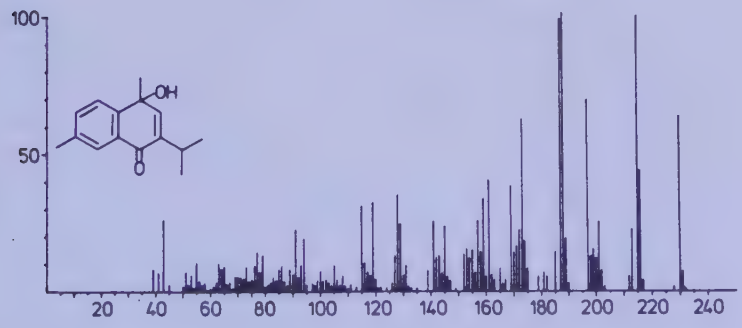


Abb. 34: Massenspektrum von Verbindung XXXVI
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

gegangen sein [M^+- CH_3 - H_2O] bzw. [M^+- CH_3 - CO]. Das Bruchstück bei m/z 188 [M^+- 42] deutet auf die Abspaltung eines C_3H_6-Fragmentes hin. Ein Spaltprodukt bei m/z 43 spricht für die Anwesenheit eines Propyl- oder Isopropylrestes.

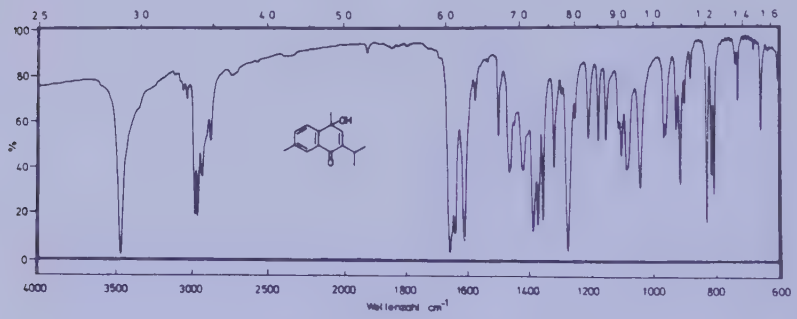


Abb. 35: IR-Spektrum (KBr) von Verbindung XXXVI

In Einklang mit dem MS treten im IR-Spektrum (Abb. 35) die Bande für eine OH-Gruppe bei 3465 cm^{-1} sowie ein Dublett für die Isopropylgruppe bei 1385 und 1368 cm^{-1} auf. Starke Banden bei 1655, 1635 und 1605 cm^{-1} sprechen für das Vorliegen eines α,β,α',β'-ungesättigten Ketons bzw. eines Diarylketons. Bei 1570 und 1495 cm^{-1} finden sich charakteristische Banden für ein sechsgliedriges aromatisches Ringsystem. Die Daten des Massen- und IR-Spektrums sprechen insgesamt für das Vorliegen eines sesquiterpenoiden Hydroxyketons.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 36) erscheinen die Signale einer Isopropylgruppe und zwar ein Dublett bei 1,10 ppm (J = 7 Hz) für die beiden äquivalenten Methylgruppen und ein Multiplett bei 3,25 ppm für das mit diesen koppelnde Methinproton. Zwei Singuletts bei 1,38 und 2,08 ppm mit der Intensität für je-

weils drei Protonen belegen das Vorhandensein von zwei Methylgruppen, von denen die letztere aufgrund der chemischen Verschiebung an dem aus dem IR-Spektrum zu entnehmenden Aromaten lokalisiert sein sollte, die erstere dagegen zu einer CH_3-C-O-Gruppierung gehören sollte. Gleichzeitig würde das bedeuten, daß diese Methylgruppe und die nachgewiesene OH-Gruppe an dem selben C-Atom lokalisiert sind. Im Bereich der chemischen Verschiebung aromatischer Protonen treten die Signale für drei Protonen auf: ein Dublett eines Dubletts bei 7,06 ppm (J = 8,5 und 1,5 Hz), ein Dublett bei 7,48 ppm (J = 8,5 Hz) sowie ein breites Singulett bei 8,16 ppm. Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten dieser Protonen zeigen, daß der Aromat 1,2,4-trisubstituiert ist, da das Dublett von Dubletts bei 7,06 ppm sowohl eine ortho- als auch eine meta-Kopplung zeigt. Als einziges weiteres Signal findet sich bei 6,48 ppm ein Dublett für ein olefinisches Proton, das mit dem Methinproton der Isopropylgruppe allylisch koppelt (J = 1 Hz). Gleichzeitig sollte es sich wegen seiner chemischen Verschiebung auch in β-Stellung zur vorhandenen Carbonylgruppe befinden, d.h. es sollte eine CO-C=CH-Gruppierung vorliegen, wobei aufgrund der chemischen Verschiebung des Methinprotons der Isopropylgruppe dieses an dem Strukturelement in α-Stellung zur CO-Gruppe zu lokalisieren wäre. Die spektroskopischen Daten sprechen insgesamt dafür, daß es sich bei der Verbindung XXXVI um 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon handelt, das von Bohlmann und Zdero [13] bereits aus dem Kraut von Heterotheca inuloides als ölige Verbindung isoliert worden ist. Die von den Autoren für diese Verbindung angegebenen spektroskopischen Daten stimmen mit denen der isolierten Verbindung überein (^{1}H-NMR-Daten s. Tab. 11).

Tab. 11: ^{1}H-NMR-Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten von Verbindung XXXVI (360 MHz; Lsgm.: C_6D_6; innerer Standard: TMS)

	Verbindung XXXVI			Literaturwerte[1)]		
Protonen	δ (ppm)	J	Hz	δ (ppm)	J	Hz
H-3	6,48 d	3/12	1	6,53 d	3/12	1
CH_3 an C-4	1,38 s			1,41 s		
H-5	7,48 d	5/6	8,5	7,52 d	5/6	8,5
H-6	7,06 dd	6/8	1,5	7,04 dd	6/8	1,5
CH_3 an C-7	2,08 s			2,10 s		
H-8	8,16 s (br)			8,14 s (br)		
H-12	3,25 m	12/13	7	3,25 dqq	12/13	7
CH_3 an C-12	1,10 d	12/14		1,11 d	12/14	
CH_3'an C-12						

1) Bohlmann u. Zdero [13]

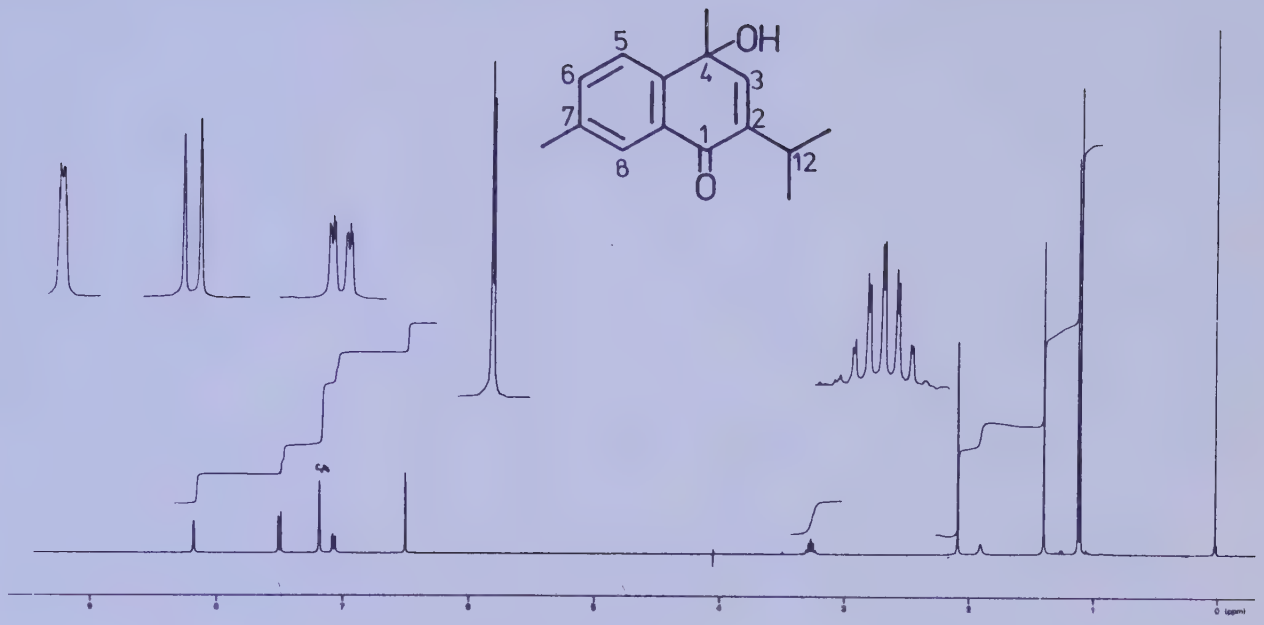
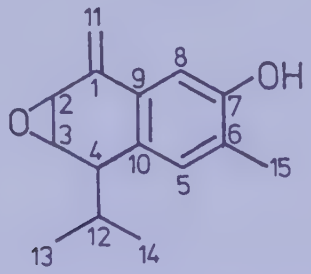


Abb. 36: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung XXXVI (4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon)

4.4. Isolierung und Identifizierung von 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren (Verbindung XXXVII)

Bei der Isolierung von Verbindung XXXVI durch präparative HPLC wurden 4 mg einer weiteren Substanz gewonnen, die sich jedoch unter Gelbfärbung zersetzte. Deshalb wurde diese Verbindung nochmals ausgehend vom Petroletherextrakt durch mehrmalige SC und HPLC isoliert (s. Exp. Teil, S. 117). Danach lagen 30 mg leicht gelblicher Kristalle gc und dc rein vor (Smp.: 139-142° C).



2,3-EPOXY-7-HYDROXY-β-CALACOREN [XXXVII]

Die Verbindung läßt sich auf der DC-Platte sowohl mit Echtblau B-Reagenz als auch mit Pikrinsäure-Reagenz detektieren, so daß sie sowohl eine phenolische OH-Gruppe als auch eine Epoxidgruppe besitzen sollte.

Im IR-Spektrum (Abb. 37) erscheinen bei 3400 cm^{-1} die Bande für eine OH-Gruppe und bei 1615, 1585 und 1510 cm^{-1} Banden für eine aromatische Struktur. Banden bei 3095 und 895 cm^{-1} deuten auf eine Exomethylengruppe hin [54]. Zwei Banden bei 1390 (m) und 1370 (s) cm^{-1} weisen auf das Vorliegen einer Isopropylgruppe hin. Absorptionsbanden bei 1250 und 820 cm^{-1} könnten als Signale einer Epoxidgruppierung interpretiert werden.

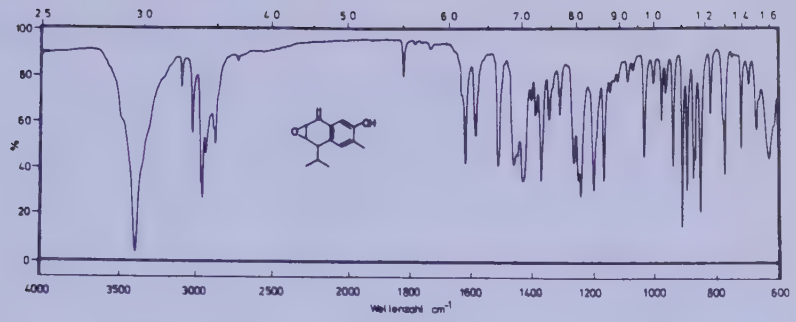


Abb. 37: IR-Spektrum (KBr) von Verbindung XXXVII

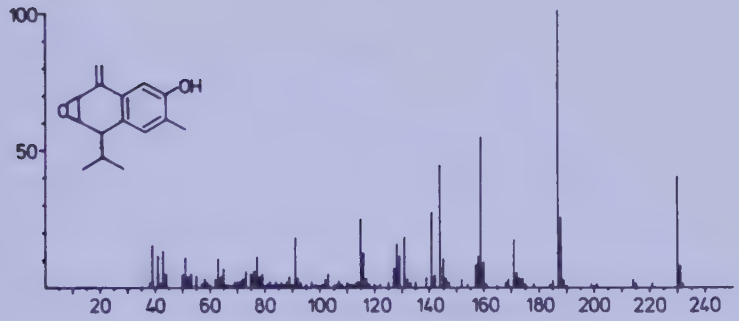


Abb. 38: Massenspektrum von Verbindung XXXVII
(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

Im Massenspektrum (Abb. 38) zeigt die Verbindung einen Molekülpeak bei m/z 230. Den Basispeak bildet ein Fragment bei m/z 187, das auf die Abspaltung einer Isopropylgruppe [M^+- 43] hindeutet. Durch Eliminierung von CO aus diesem Fragment könnte das Bruchstück bei m/z 159 hervorgegangen sein [M^+- (C_3H_7 + CO)].

Im Einklang mit dem IR-Spektrum und dem MS erscheinen im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 39) zwei Dubletts bei 0,888 und 0,865

ppm (J = 7 Hz) mit der Intensität für jeweils drei Protonen, die von den beiden Methylgruppen der Isopropylgruppe hervorgerufen werden. Das Signal für das mit ihnen koppelnde Methinproton erscheint als Multiplett (dqq) bei 1,993 ppm. Bei 2,192 ppm tritt ein Singulett mit der Intensität für drei Protonen auf, das die Anwesenheit einer an einem Aromaten lokalisierten Methylgruppe belegt. Im Bereich der chemischen Verschiebung aromatischer Protonen erscheinen nur zwei Singuletts mit der Intensität für jeweils ein Proton bei 6,812 ppm und 6,843 ppm. Danach liegt im Molekül ein 1,2,4,5-tetrasubstituierter Aromat vor. Ein weiteres Singulett bei 4,950 ppm ist dem Proton einer phenolischen OH-Gruppe zuzuordnen, da das Signal bei Zusatz von D_2O nicht mehr auftritt. Als Substituenten des tetrasubstituierten Aromaten müssen deshalb eine Methyl- und eine Hydroxylgruppe vorhanden sein. Weiterhin finden sich im tiefen Feld zwei Singuletts mit der Intensität für jeweils ein Proton, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung (5,382 und 5,572 ppm) den beiden geminalen Protonen einer Exomethylengruppe zugeordnet werden können, die als Strukturelement bereits dem IR-Spektrum zu entnehmen war.

Ober die genannten Signale hinaus treten im ^{1}H-NMR-Spektrum nur noch drei Signale für drei Protonen auf (H-2, H-3 und H-4): ein Dublett bei 3,798 ppm (J = 4,5 Hz), ein Dublett eines Dubletts bei 3,620 ppm (J = 4,5 Hz und 2 Hz) und ein sehr breites Singulett bei 3,255 ppm. Bei Einstrahlung auf das Dublett bei 3,798 ppm (H-2) verändert sich das Signal bei 3,620 ppm (H-3) zu einem nicht ganz aufgelösten Dublett mit der Kopplungskonstante J = 2 Hz. Sowohl die chemische Ver-

schiebung als auch die Kopplungskonstante J = 4,5 Hz sprechen dafür, daß diese beiden Protonen zu einer Epoxidgruppe gehören, die bereits aufgrund der positiven Reaktion mit Pikrinsäure-Reagenz als Strukturelement zu erwarten war. Gleichzeitig spaltet bei dieser Einstrahlung das breite Singulett bei 3,255 ppm (H-4) zu einem nicht vollständig aufgelösten Dublett eines Dubletts auf, mit den Kopplungskonstanten J = 2 Hz und 4 Hz. Daraus geht hervor, daß dieses Proton der zweite Kopplungspartner (J = 2 Hz) des Protons (H-3) ist, dessen Signal bei 3,620 ppm lokalisiert ist. Außer der Fernkopplung mit H-2, die sich auch aus dem breiten Signal bei 3,798 ppm zu erkennen gibt (J = <1 Hz) und der Kopplung mit H-3, koppelt das Proton (H-4) mit dem Signal bei 3,255 ppm mit dem Methinproton der Isopropylgruppe (J = 4 Hz). Bei Einstrahlung auf das Signal des Methinprotons bei 1,993 ppm verschmälert sich das sehr breite Signal, ohne jedoch aufgelöst zu werden. Dies bedeutet, daß die Isopropylgruppe am selben C-Atom lokalisiert ist, wie das Proton, das das breite Signal bei 3,255 ppm hervorruft.

Die ^{1}H-NMR-Daten von Verbindung XXXVII stehen insgesamt widerspruchsfrei im Einklang mit dem Vorliegen der Grundstruktur eines 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacorens (s. Tab. 12). Wie im Kap. 3.2.3.2. gezeigt wurde, sind nicht oxidierte Calacorene Bestandteile des ätherischen Öles. Im Kraut von Heterotheca inuloides wurden von Bohlmann und Zdero [13] eine Verbindung mit der Grundstruktur eines 7-Hydroxy-α-calacorens (s. Kap. 3.2.4.1.) und von Bohlmann et al. [55] in einer anderen Heterotheca Art, H. grandiflora, 7-Hydroxy-β-calacoren nachgewiesen. Ein 2,3-Epoxy-Derivat der letzteren Verbindung ist

unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben worden, so daß es sich bei der isolierten Verbindung um einen neuen Naturstoff handelt. Die sterische Anordnung des Epoxidringes und der Isopropylgruppe können aus den ^{1}H-NMR-Daten nicht zweifelsfrei entnommen werden. Aus den Betrachtungen am Dreiding-Modell geht lediglich hervor, daß diese trans-ständig sein müssen, da nur bei diesem Fall eine Kopplungskonstante von J = 2 Hz zwischen H-3 und H-4 auftreten kann. Bei einer cis-Stellung wäre eine Kopplungskonstante von ca. 7-9 Hz zu erwarten. Unter willkürlicher Zugrundelegung der Isopropylgruppe als β-ständig, wie sie von Bohlmann et al. [55] für 7-Hydroxy-β-calacoren angegeben wird, handelt es sich deshalb bei Verbindung XXXVII um 2,3-α-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren. Es sei darauf hingewiesen, daß die ^{1}H-NMR-Daten auch eine Vertauschung der Stellung der Methyl- und Hydroxylgruppe am Aromaten zulassen. Dies würde jedoch bedeuten, daß der Verbindung dann ein biogenetisch irregulär gebautes, bisher nicht bekanntes Grundgerüst zukommen würde, während die Formulierung als Calacoren-Derivat in Obereinstimmung mit der Biogenese und mit anderen Verbindungen dieses Typs in der Pflanze steht (s. Verbindung XXI und XXII).

Tab. 12: ^{1}H-NMR-Daten von Verbindung XXXVII (360 MHz; Lsgm.: $CDCl_3$; innerer Standard: TMS)

Protonen	δ (ppm)	J	Hz
H-2	3,798 d	2/4	< 1
H-3	3,620 dd	3/2	4,5
H-4	3,255 s (s br)	4/3	2 5
H-5	6,843 s		
H-8	6,812 s		
H-11a	5,572 s		
H-11b	5,382 s		
H-12	1,993 m	12/4	4
CH_3 an C-12	0,888 d	12/13	7
CH_3 an C-12	0,865 d	12/14	
CH_3 an C-6	2,192 s		
OH an C-7	4,950 s		

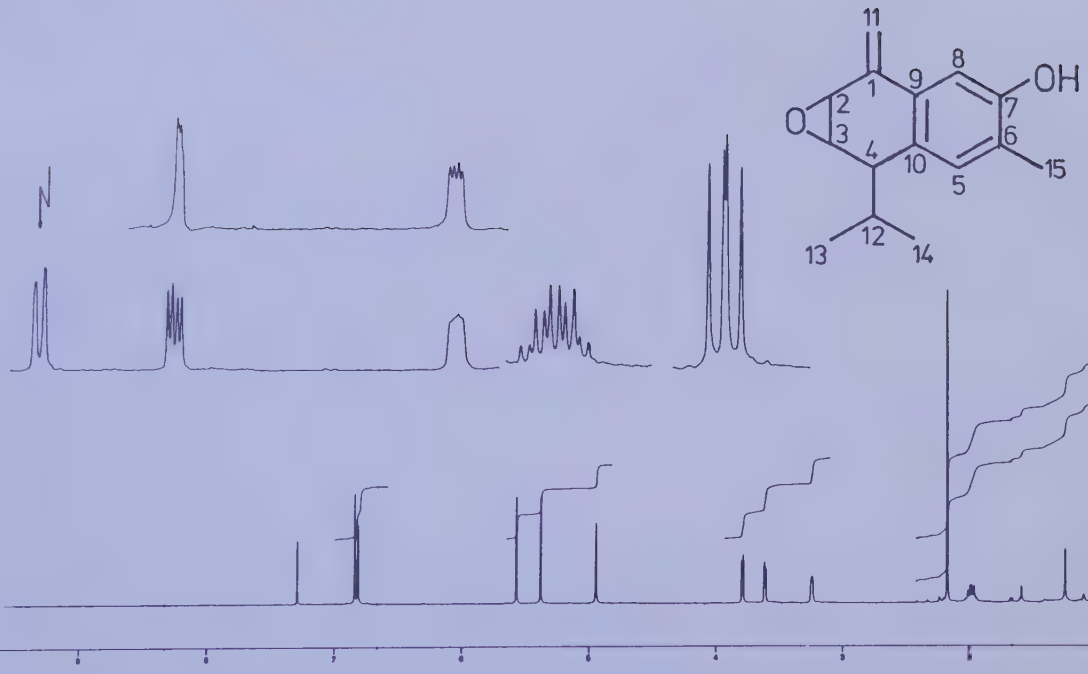


Abb. 39: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung XXXVII (2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren)

4.5. Triterpene

Die nach Abtrennung der Verbindungen XXXVI und XXXVII aus der Triterpenfraktion A 7 (s. Tab. 17, S. 115) erhaltenen Teilfraktionen mit den Triterpenen wurden vereinigt und erneut sc aufgetrennt. Die hierbei anfallenden Triterpene wurden acetyliert und als Acetate sc an Kieselgel gereinigt. Danach lagen 43 mg dc in mehreren Systemen einheitliche Triterpenacetate vom Smp. 175-178° C vor (DC-System 1,3 und 7; R_f 0,98, 0,97 bzw. 0,43). Ihre wachsartige Konsistenz deutete jedoch auf eine Verunreinigung mit höheren aliphatischen Alkoholen hin, die bei chromatographischen Trennungen häufig gemeinsam mit den Triterpenen anfallen [56,57] und ein gleiches dc Laufverhalten zeigen. Gaschromatographisch lassen sie sich aufgrund ihrer deutlich geringeren Retentionszeiten eindeutig von den Triterpenen differenzieren.

Die GC-Analyse der acetylierten Triterpene an einer OV-1-Kapillarsäule ergab, daß diese, wie vermutet, mit aliphatischen Alkoholacetaten vergesellschaftet waren (s. Abb. 41 A). Im Bereich der Triterpenacetate traten fünf Peaks auf (relative Retentionszeit, RRT, bezogen auf Cholesterinacetat 1,48, 1,52, 1,64, 1,69, 1,87), von denen zwei nach direktem Vergleich und aufgrund der relativen Retentionszeit [58] mit β-Amyrinacetat (Peak-Nr. 2, RRT 1,52) bzw. α-Amyrinacetat und/oder Cycloartenolacetat (Peak-Nr. 3, RRT 1,64), die sich hier nicht trennen, identisch waren. Zur sicheren Identifizierung war deshalb eine weitere Auftrennung des Triterpengemisches notwendig.

Eine Auftrennung der Triterpenacetate war an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten zu erwarten, wofür in der

Literatur zahlreiche Angaben vorliegen [u.a. 57,58,69]. Das Trennprinzip beruht hierbei auf der π-Komplexbildung der Silberionen mit den Doppelbindungen der zu trennenden Verbindungen, wobei deren Anzahl, Lage und räumliche Anordnung die Auftrennung beeinflussen.

An mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten im DC-System 2 trennte sich das Triterpengemisch in drei Zonen auf, von denen die oberste und stärkste Zone (R_f 0,65) dieselbe Laufhöhe und Anfärbung zeigte wie mitchromatographiertes α- und β-Amyrinacetat (s. Abb. 40). Die mittlere Zone (R_f 0,45) lag auf der Höhe von Cycloartenol- und Lanosterinacetat, die sich hier nicht trennen. Die dritte, sehr schwache Zone erschien auf der Höhe von Lupeolacetat.

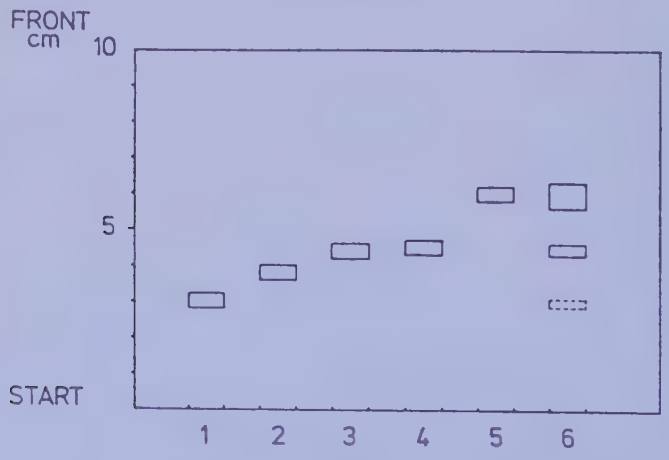


Abb. 40: DC der Triterpenacetate (6) an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel-Platten (System 2)
1 : Lupeolacetat
2 : Butyrospermolacetat
3 : Cycloartenolacetat
4 : Lanosterinacetat
5 : α- u. β-Amyrinacetat

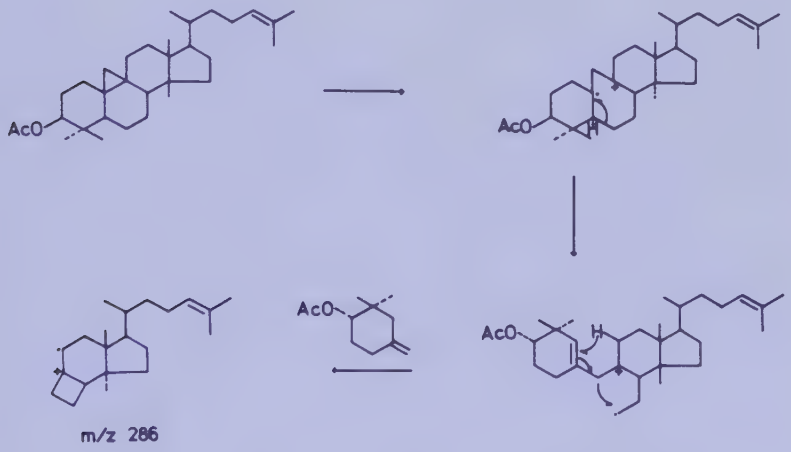
Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten wurde das Triterpenacetatgemisch präparativ an mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel sc und dc aufgetrennt und die dabei erhaltenen Fraktionen jeweils der GC und der gekoppelten GC/MS-Analyse unterworfen, die für die Identifizierung komplex zusammengesetzter Triterpengemische heute generell eingesetzt wird [u.a. 52,62,63,69].

In der dc einheitlichen, mit α- und β-Amyrinacetat auf einer Höhe liegenden Zone wurden gc neben den hier auftretenden aliphatischen Alkoholacetaten vier Triterpenacetate nachgewiesen, von denen die beiden Hauptkomponenten im direkten Vergleich mit β- und α-Amyrinacetat übereinstimmten (Peak-Nr. 2 und 3; RRT 1,52 bzw. 1,64; s. Abb. 41 B; Formeln s. Abb. 42). Die Massenspektren beider Verbindungen (M^+ jeweils m/z 468) waren identisch mit den unter denselben Bedingungen aufgenommenen Spektren der Vergleichssubstanzen sowie mit dem in der Literatur [61,62,63] angegebenen Fragmentierungsmuster dieser beiden Triterpenacetate vom Δ12-Oleanan- bzw. Δ12-Ursan-Typ. Charakteristisch für das Zerfallsmuster dieses Triterpentyps ist das Auftreten der Fragmente m/z 249, 218 (Basispeak), 203 und 189, die, bedingt durch die Δ12-Doppelbindung, aus einer Retro-Diels-Alder-Spaltung hervorgehen (m/z 249 und 218) bzw. durch anschließende Abspaltung von Essigsäure aus dem Fragment m/z 249 (= m/z 189) und einer Methylgruppe aus dem Fragment m/z 218 (= m/z 203). Die Massenspektren der beiden isomeren Amyrinacetate unterscheiden sich lediglich in den Intensitäten der Spaltprodukte bei m/z 203 und 189 (bei α-Amyrinacetat ist m/z 189 größer als m/z 203, bei β-Amyrinacetat umgekehrt).

Bei der Komponente mit der RRT von 1,69 (Peak-Nr. 4; Abb. 41 B) handelt es sich aufgrund des Molekülpeaks (M^+ = m/z 468) und des Fragmentierungsmusters ebenfalls um ein pentacyclisches Triterpenacetat mit einer Doppelbindung im Molekül. Die charakteristischen Fragmente bei m/z 301, 289 (Basispeak), 241, 229, 205 und 204 lassen sich nach den vorliegenden Literaturangaben am besten unter der Annahme einer Baueren-Struktur (s. Abb. 42) erklären, die im Ringsystem eine $\Delta 7$-Doppelbindung führt [61]. Die Verbindung zeigt dasselbe Fragmentierungsmuster wie die Vergleichssubstanz Bauerenolacetat, dessen MS unter denselben Bedingungen aufgenommen wurde. Sie unterscheidet sich jedoch von dieser Verbindung durch eine unterschiedliche Intensität der Spaltprodukte bei m/z 289 und 229 sowie durch eine wesentlich kürzere gc Retentionszeit (RRT 1,69; Bauerenolacetat RRT 1,98). Wegen fehlender Vergleichssubstanz konnte dieses Triterpen nicht identifiziert werden.

In den nach Abtrennung der Amyrine erhaltenen Fraktionen ließen sich gc sechs weitere Triterpenacetate nachweisen (s. Abb. 41 C; RRT 1,41, 1,52, 1,64, 1,68, 173 und 1,87), von denen zwei im direkten Vergleich mit Lanosterinacetat (Peak-Nr. 2) und Cycloartenolacetat (Peak-Nr. 3, Hauptkomponente) übereinstimmten (Formeln s. Abb. 42). Das Fragmentierungsmuster des MS der in Peak 2 erscheinenden Komponente (MS aufgenommen aus einer mit dieser Verbindung angereicherten Zwischenfraktion) war mit dem der Vergleichssubstanz Lanosterinacetat und dem in der Literatur [63,66] für diese Verbindung angegebenen Zerfallsmuster identisch (s. Tab. 13).

Die gc mit Cycloartenolacetat übereinstimmende Verbindung zeigte im MS das charakteristische Fragmentierungsmuster tetracyclischer Triterpene mit einem 9,19-Cyclopropanring [62,63,64,65] und stimmte hierin vollständig mit dem MS der Vergleichssubstanz überein (s. Tab. 13).
Bei diesem Verbindungstyp kommt es unter Öffnung des Cyclopropanringes und einer McLafferty-Umlagerung zum Verlust des Ringes A und eines Wasserstoffatoms, wie dies für Cycloartenolacetat im folgenden Schema dargestellt ist:



Das dabei entstehende Spaltprodukt hat bei Cycloartenolacetat die Massenzahl m/z 286. Es ist unabhängig von der Substitution des Ringes A an C-4. Seine Massenzahl unterscheidet sich bei verschiedenen tetracyclischen 9,19-Cyclopropan-Triterpenen lediglich durch die Differenz der Massenunterschiede ihrer Seitenketten. Von diesem Spaltprodukt wird anschließend die anguläre Methylgruppe und die Seitenkette abgespalten, wodurch bei Cycloartenolacetat die Fragmente m/z 271 und m/z 175 gebildet werden.

Die außer dem Molekülpeak [M^+ = m/z 468] bei tetracyclischen Triterpenacetaten immer auftretenden Spaltprodukte resultieren aus der Abspaltung einer angulären Methylgruppe [M^+- CH_3 = m/z 453], der Acetatgruppe in Form von Essigsäure [M^+- AcOH = m/z 408] sowie beider Gruppen [M^+- (CH_3 + AcOH) = m/z 393]. Weitere charakteristische Fragmente entstehen durch die Abspaltung der Seitenkette an C-17. Aus den hieraus resultierenden Bruchstücken bei m/z 357 [M^+- SK] und m/z 297 [M^+- (SK + AcOH)] geht hervor, daß diese Seitenkette aus acht C-Atomen mit einer Doppelbindung besteht. Seitenketten, die eine Doppelbindung tragen, können dabei auch zusammen mit zwei H-Atomen aus dem Ringsystem abgespalten werden, woraus die Spaltprodukte bei m/z 355 bzw. 295 entstehen. Weiterhin erfolgt bei den tetracyclischen Triterpenen wie bei den Steroiden leicht eine Spaltung zwischen den C-Atomen 13 und 17. Dieses Primärspaltprodukt wird weiter abgebaut, wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet. Als Spaltprodukte treten hierdurch bei Cycloartenolacetat die Bruchstücke bei m/z 315 [M^+- (SK + 42)] und m/z 255 [M^+- (SK + 42 + AcOH)] auf. Anders als beim Cholestanringsystem der Steroide spielen diese Spaltprodukte beim tetracyclischen Lanostanringgerüst nur eine relativ untergeordnete Rolle. Hier wird die Fragmentierung durch die Anwesenheit der Methylgruppe an C-14 beeinflußt. Das Auftreten der Fragmente bei m/z 301 [M^+- (SK + 42 + CH_2)] und m/z 241 [M^+- (SK + 42 + CH_2 + AcOH)] belegt die Anwesenheit der Methylgruppe an C-14.

Die in Peak 5 und 6 erscheinenden Verbindungen (RRT 1,73 und 1,87; s. Abb. 41 C) stimmten im Fragmentierungsmuster ihrer

Massenspektren überein [M^+ jeweils m/z 468]. Unterschiede traten lediglich in den Intensitäten einzelner Spaltprodukte auf (s. Tab. 14). Der Basispeak bei m/z 189 und die übrige Fragmentierung deuten darauf hin, daß es sich bei ihnen um Isomere des pentacyclischen Triterpens Lupeolacetat handeln könnte [61,69], das mit Ausnahme der relativen Intensitäten einzelner Bruchstücke dasselbe Fragmentierungsmuster zeigt (s. Tab. 14), sich aber im GC deutlich von ihnen unterscheidet (RRT 1,66).

Die Analyse der Triterpenfraktion läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß die Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides zehn Triterpene führen, von denen α-Amyrin (Hauptkomponente), β-Amyrin, Cycloartenol und Lanosterin identifiziert wurden (Verbindung XXXVIII - XLI). Bei drei weiteren handelt es sich um pentacyclische Triterpene, von denen einem wahrscheinlich eine Baueren-Struktur und zwei anderen möglicherweise eine Lupen-Struktur zukommt.

Tab. 13: Ergebnisse der MS-Untersuchungen der acetylierten tetracyclischen Triterpene

Fragmentierung	Cycloartenol-Ac. RRT 1,64		Lanosterol-Ac. RRT 1,52	
	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%
M^+ (Molekülion)	468	(8)	468	(23)
M^+- CH_3	453	(5)	453	(45)
M^+- AcOH	408	(41)	408	(2)
M^+- [CH_3+AcOH]	393	(28)	393	(63)
M^+- [AcOH+43(?)]	365	(15)	-	
M^+- [SK(=Seitenkette)]	357	(2)	357	(1)
M^+- [SK+2H]	355	(3)	355	(2)
M^+- [AcOH+69(C_2-C_4)]	339	(13)	-	
M^+- [SK+42+(C_{15}-C_{17})]	315	(1)	315	(3)
M^+- [SK+42+CH_2]	301	(1)	301	(12)
M^+- [Ring A]	286	(24)	-	
M^+- [SK+AcOH]	297	(7)	297	(6)
M^+- [SK+AcOH+2H]	295	(4)	295	(3)
M^+- [Ring A+CH_3]	271	(13)	-	
M^+- [SK+42+AcOH]	255	(5)	255	(9)
M^+- [SK+42+CH_2+AcOH]	241	(3)	241	(20)
M^+- [Ring A+SK]	175	(40)	-	
	69	(100)	69	(100)

Tab. 14: Ergebnisse der MS-Untersuchungen der acetylierten pentacyclischen Triterpene

	β-Amyrin-Ac. RRT 1,52		α-Amyrin-Ac. RRT 1,64		pentacycl. Triterpen-Ac. RRT 1,69		pentacycl. Triterpen-Ac. RRT 1,73		pentacycl. Triterpen-Ac. RRT 1,87		Lupeol-Ac als Vergleich RRT 1,66	
	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%
M^+	468	(3)	468	(5)	468	(25)	468	(11)	468	(13)	468	(18)
$M^+ - CH_3$	453	(1)	453	(3)	453	(16)	453	(3)	453	(2)	453	(9)
$M^+ - AcOH$	408	(1)	408	(3)	-		408	(3)	408	(10)	408	(6)
$M^+ - [CH_3+AcOH]$	393	(2)	393	(2)	393	(17)	393	(5)	393	(5)	393	(8)
	249	(2)	249	(2)	301	(12)	357	(13)	357	(1)	357	(7)
	218	(100)	218	(100)	289	(100)	299	(6)	299	(1)	299	(8)
	203	(41)	203	(19)	255	(10)	289	(5)	289	(7)	289	(4)
	189	(20)	189	(24)	241	(30)	276	(4)	-		276	(15)
	133	(8)	133	(15)	229	(83)	249	(20)	249	(15)	249	(15)
					205	(30)	218	(26)	218	(4)	218	(36)
					204	(13)	205	(35)	205	(10)	205	(28)
					189	(13)	204	(33)	204	(18)	204	(50)
							203	(23)	203	(12)	203	(42)
							189	(100)	189	(100)	189	(100)

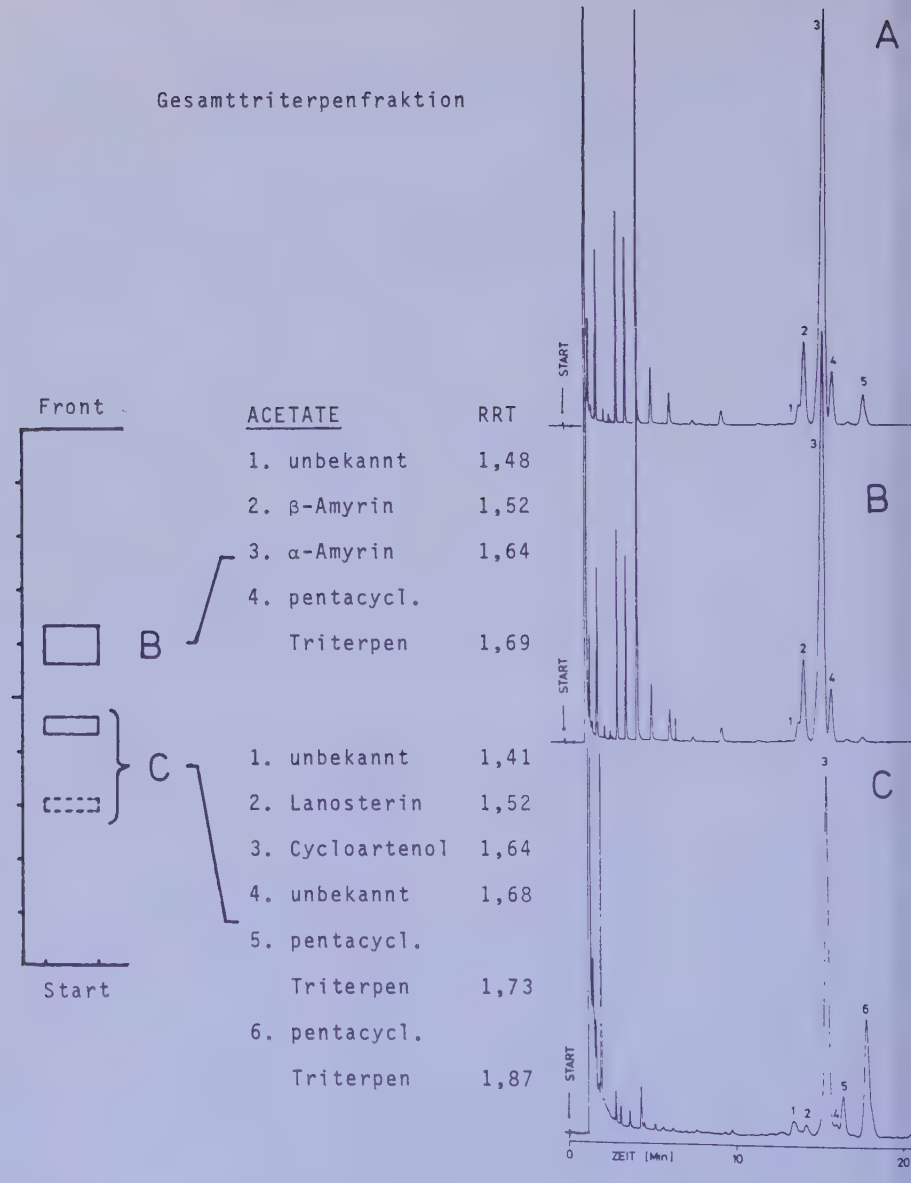


Abb. 41: Kapillargaschromatogramm der acetylierten Triterpenfraktion (A) sowie der nach Trennung an mit $AgNO_3$ imprägniertem Kieselgel erhaltenen Einzelfraktionen (B und C)

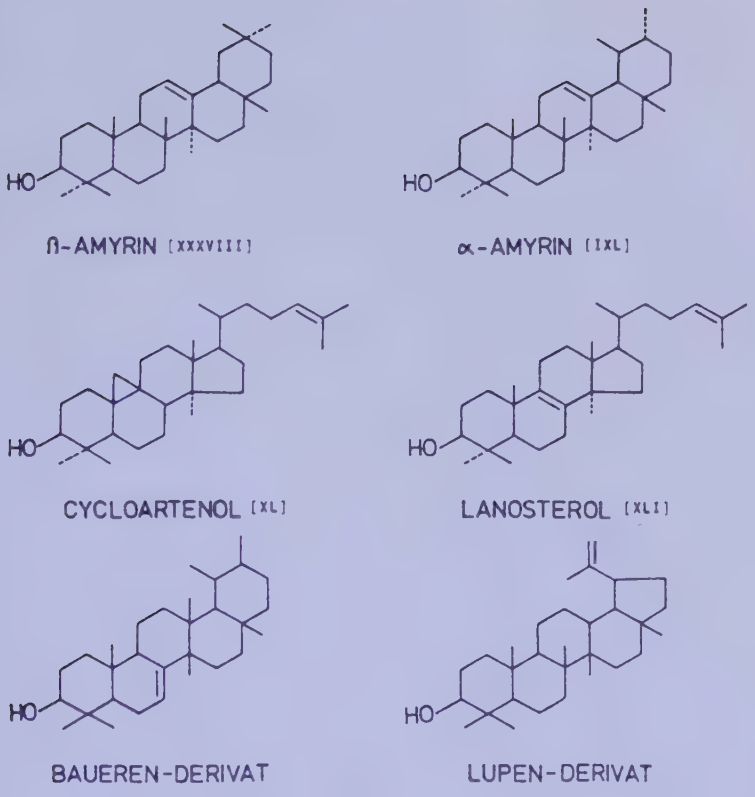


Abb. 42: Strukturformeln der identifizierten Triterpene

4.6. Die Zusammensetzung der Sterinfraktion

In der sc aus dem Petroletherextrakt abgetrennten Sterinfraktion (A 9; s. Tab. 17, S. 115) ließen sich dc nach Detektion mit Molybdatophosphorsäure-Reagenz mit Hilfe von Vergleichssubstanzen Δ5- und Δ7-Sterine nachweisen (s. Abb. 43). Die Hauptmenge wurde von den mit dem Reagenz unter Braun- bis Braunviolettfärbung reagierenden Δ7-Sterinen gebildet, während die hierbei rötlich bis braunviolett erscheinenden Δ5-Sterine nur in Spuren vorlagen.

Nach mehrmaliger SC an Kieselgel konnten aus der Fraktion 104 mg Δ7-Sterine kristallin und in mehreren dc-Systemen einheitlich gewonnen werden (Schmelzbereich 158-161° C). An ei-

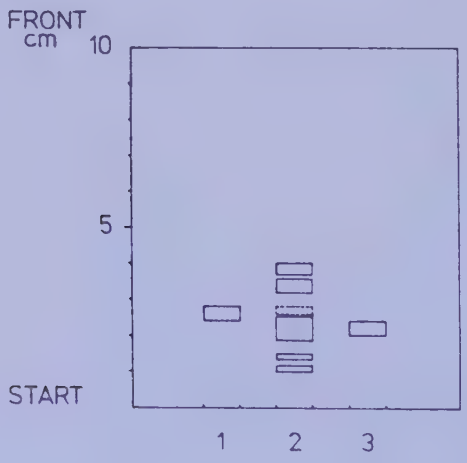


Abb. 43: DC der Sterinfraktion (A 9) in System 1
1 : Cholesterin
2 : Sterinfraktion (A 9)
3 : Δ7-Steringemisch aus 24-Methylcholest-7-enol, α-Spinasterol, Δ7-Stigmastenol u. Δ7-Avenasterol

ner OV-1-Kapillarsäule trennte sich das Steringemisch in fünf Komponenten auf, von denen vier durch Koinjektion der Vergleichssubstanzen als 24-Methylcholest-7-enol (XLI), α-Spinasterol (XLII), Δ7-Stigmasterol (XLIII) und Δ7-Avenasterol (XLIV) identifiziert wurden (s. Abb. 44 und 46). Hauptkomponente war α-Spinasterol.

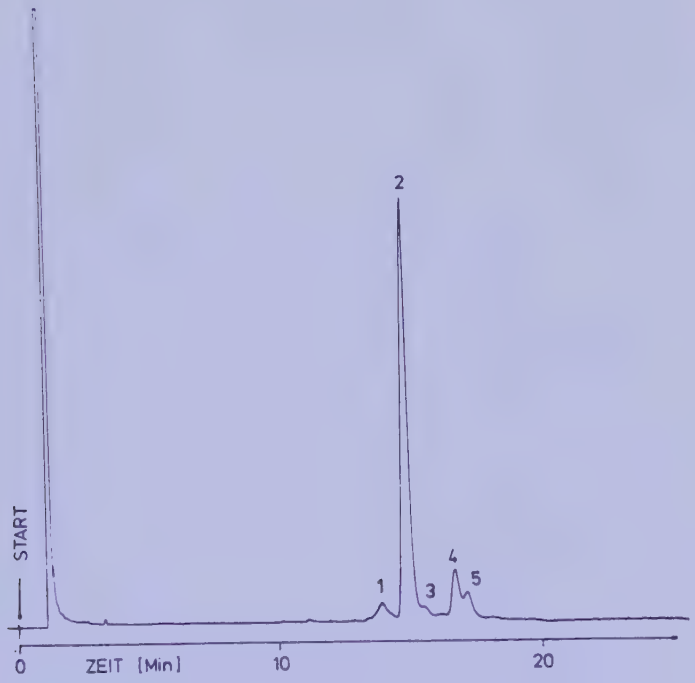


Abb. 44: Kapillargaschromatogramm der isolierten Δ7-Sterine (System 6)
1 : 24-Methylcholest-7-enol
2 : α-Spinasterol
3 : unbekannt
4 : Δ7-Stigmastenol
5 : Δ7-Avenasterol

Zur Absicherung der dc und gc Ergebnisse wurden die Sterine einer GC/MS-Analyse an einer OV-1-Kapillarsäule unterworfen, da ihr charakteristisches Fragmentierungsmuster bereits gut untersucht ist [67,68].

Δ7-Sterine geben im Massenspektrum einen Molekülpeak. Immer auftretende Spaltprodukte resultieren aus der Sprengung der von den quartären C-Atomen 10 und 13 ausgehenden Bindungen. Eliminierung einer angulären Methylgruppe führt zur Bildung eines Fragmentes M^+- 15. Als Hydroxysteroide neigen die Δ7-Sterine weiterhin zur Abspaltung von Wasser, so daß die Bruchstücke M^+- H_2O und M^+- [CH_3 + H_2O] auftreten. Charakteristisch für Δ7-Sterine ist, daß bei ihnen im Gegensatz zu den Δ5-Sterinen folgende Fragmente nicht auftreten: M^+- [H_2O + 67 (C_5H_7)], M^+- [H_2O + 93 (C_7H_9)] und M^+- [H_2O + 121 (C_9H_{13})]. Dafür erscheinen bei ihnen die Bruchstücke M^+- [Seitenkette + 27] und M^+- [Seitenkette + 27 + HO] mit viel größerer Intensität als bei den Δ5-Sterinen. Außerdem zeigen sie in der Regel intensive Molekülionen und in den meisten Fällen bildet das Fragment m/z 255 M^+- [Seitenkette + H_2O] den Basispeak [67].

Die weitere Fragmentierung erfolgt wie bei den Δ5-Sterinen. Am C-17 wird leicht die Seitenkette abgespalten (M^+- Seitenkette). Darüberhinaus erfolgt leicht eine Spaltung zwischen den C-Atomen 13 und 17. Dieses Primärspaltprodukt wird weiter abgebaut, wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet [51]. Als Spaltprodukte entstehen die Fragmente 231 und 213, d.h. M^+- [Seitenkette + 42] bzw. M^+- [Seitenkette + 42 + H_2O]. Das Primärspaltprodukt kann jedoch auch durch einen Bruch zwischen C-15 und

C-16 weiter abgebaut werden, woraus Bruchstücke mit den Massezahlen 246 und 229 resultieren, d.h. M^+- [Seitenkette + 27] bzw. M^+- [Seitenkette + 27 + OH]. Die Fragmente m/z 273, 255, 246, 231, 229 und 213 sind allen Δ7- und Δ5-Sterinen gemeinsam.

Δ5-Sterine, mit einer Doppelbindung in der Seitenkette, geben sich im Massenspektrum durch das Fragment m/z 271 zu erkennen, das durch Verlust der Seitenkette an C-17 unter gleichzeitiger Umlagerung zweier H-Atome gebildet wird. Außerdem treten bei ihnen charakteristische Peaks bei m/z 314, 296 und 281 auf, die durch Verlust nur eines Teils der Seitenkette entstehen und durch eine McLafferty-Umlagerung formuliert werden können. Liegen Δ5-Sterine vor, so hat das Fragment bei m/z 314 eine größere Intensität als das Bruchstück bei m/z 271. Bei Δ7-Sterinen gilt dagegen das Umgekehrte [68].

Wegen der starken Konzentrationsunterschiede konnten saubere Massenspektren nur von den in Peak 2 und 4 erscheinenden Verbindungen erhalten werden. Ihr Fragmentierungsmuster (s. Tab. 15) stimmte mit den Literaturangaben für α-Spinasterol bzw. Δ7-Stigmastenol [69,70] und mit den unter den gleichen Bedingungen aufgenommenen Massenspektren der authentischen Verbindungen überein.

Neben der Fraktion der Δ7-Sterine wurde bei der sc Auftrennung der Sterinfraktion eine Fraktion (4 mg) erhalten, in der die Δ5-Sterine vorlagen. Im Gaschromatogramm (s. Abb. 45) ließen sich hier sieben Verbindungen nachweisen, von denen vier durch Koinjektion der Vergleichssubstanzen Cholesterol (XLI), Campesterol (XLII), Stigmasterol (XLIII) und β-Sitosterol (XLIV) zugeordnet werden konnten. Die Identität der

Verbindungen mit diesen Sterinen wurde durch anschließende GC/MS-Analyse dieser Fraktion bestätigt. Ihr Fragmentierungsmuster stimmt sowohl mit den Literaturangaben [67,71,72] als auch mit den gleichzeitig aufgenommenen Spektren der Vergleichssubstanzen überein (s. Tab. 15).

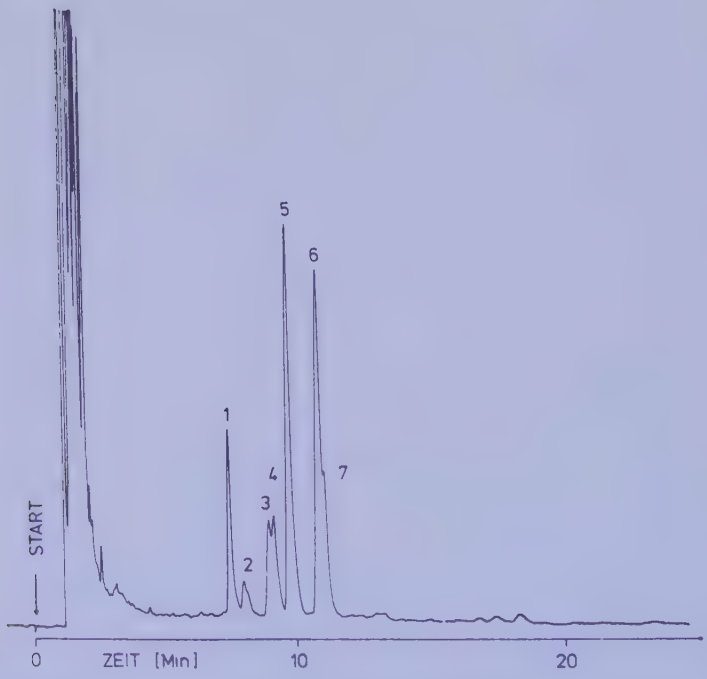


Abb. 45: Kapillargaschromatogramm der Fraktion der Δ5-Sterine (System 6)

1 : Cholesterol
2 : unbekannt
3 : unbekannt
4 : Campesterol
5 : Stigmasterol
6 : β-Sitosterol
7 : Stigmastanol

Aufgrund der Massenspektren handelt es sich bei den in Peak 2 und 3 erscheinenden Verbindungen nicht um Sterine, da sie keine der für Sterine charakteristischen Fragmente aufweisen. Von der Verbindung in Peak 7 konnte nur ein Massenspektrum aufgenommen werden, das von β-Sitosterol überlagert war. Aufgrund des Molekülpeaks bei m/z 416 und weiterer Fragmente bei m/z 401, 257, 248, 233 und 215 [70,73] sowie der GC-Analyse mit Koinjektion der authentischen Verbindung handelt es sich bei dieser Verbindung um Stigmastanol (Formeln s. Abb. 46).

Tab. 15: Ergebnisse der MS-Untersuchungen der Sterine

Fragmentierung	Cholesterol		Campesterol		Stigmasterol		Sitosterol		Stigmastanol		α-Spinasterol		Δ7-Stigmastenol	
	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%	m/z	rel.Int.%
M^+ Molekülion	386	(49)	400	(56)	412	(100)	414	(100)	416		412	(32)	414	(95)
M^+-CH_3	371	(16)	385	(19)	397	(12)	399	(37)	401		397	(9)	399	(37)
M^+-H_2O	368	(29)	382	(29)	394	(22)	396	(64)	398		394	(2)	396	(10)
$M^+-[CH_3+H_2O]$	353	(24)	367	(21)	379	(18)	381	(43)	383		379	(3)	381	(8)
$M^+-43(C_{25}-C_{27})$	-		-		369	(19)	-		-		369	(13)	-	
$M^+-[43+H_2O]$	-		-		351	(33)	-		-		351	(7)	-	
$M^+-[(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		314	(21)	-		-		314	(2)	314	(6)
$M^+-[H_2O+67]$	301	(48)	315	(37)	327	(2)	329	(73)	-		-		-	
$M^+-[CH_3+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		299	(51)	-		-		299	(8)	-	
$M^+-[H_2O+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		296	(10)	-		-		296	(1)	-	
$M^+-[CH_3+H_2O+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		281	(13)	-		-		281	(2)	-	
$M^+-[H_2O+93]$	275	(38)	289	(32)	301	(2)	303	(47)	-		301	(4)	-	
$M^+-[SK(Seitenkette)]$	273	(22)	273	(17)	273	(18)	273	(32)	-		273	(32)	273	(43)
$M^+-[SK+2H]$	271	(4)	271	(3)	271	(64)	271	(3)	-		271	(100)	271	(15)
$M^+-[H_2O+108(C_8H_{12})]$	260	(5)	274	(9)	286	(8)	288	(4)	290		286	(3)	-	
$M^+-[H_2O+121]$	247	(17)	261	(12)	273	(18)	275	(9)	-		273	(32)	275	(8)
$M^+-[SK+H_2O]$	255	(27)	255	(29)	255	(79)	255	(53)	257		255	(43)	255	(100)
$M^+-[SK+H_2O+2H]$	-		-		253	(28)	-		-		253	(8)	-	
$M^+-[SK+27(C_{16}-C_{17})]$	246	(18)	246	(7)	246	(1)	246	(4)	248		246	(18)	246	(13)
$M^+-[SK+42(C_{15}-C_{17})]$	231	(22)	231	(28)	231	(4)	231	(29)	233		231	(10)	231	(23)
$M^+-[SK+27+OH]$	229	(17)	229	(12)	229	(14)	229	(20)	231		229	(17)	229	(44)
$M^+-[SK+27+H_2O]$	228	(8)	228	(13)	228	(8)	228	(12)	230		228	(4)	228	(6)
$M^+-[SK+42+H_2O]$	213	(41)	213	(43)	213	(31)	213	(51)	215		213	(12)	213	(38)

Bei Stigmastanol konnten die relativen Intensitäten wegen Überlagerung nicht aus dem MS entnommen werden.

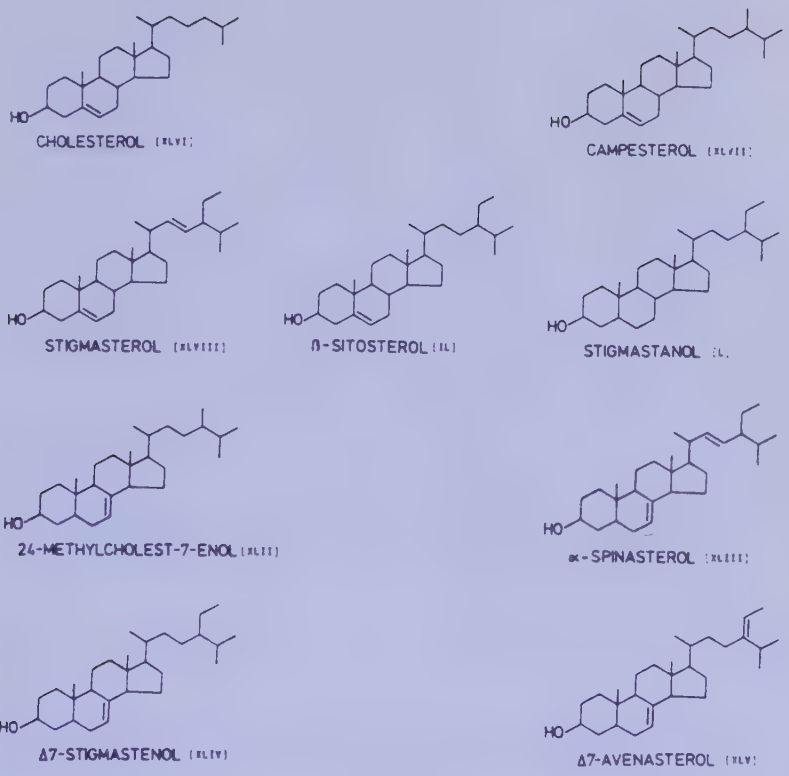


Abb. 46: Strukturformeln der identifizierten Δ5- und Δ7-Sterine

4.7. Dünnschichtchromatographische Unterscheidung der Blütenkörbchen von H. inuloides und A. montana anhand der ätherischen Öle und der Petroletherextrakte. Zuordnung der identifizierten Verbindungen

Die gc Analyse des ätherischen Öles und die Isolierung von Cadinen- und Isocadinenderivaten ließen erwarten, daß sich die Blüten von H. inuloides durch DC-Analyse des ätherischen Öles und des Petroletherextraktes sicher von den A. montana-Blüten unterscheiden lassen. Als hierfür gut geeignet erwies sich das DC-System 1 (Petrolether/Ethylacetat/Toluol 80/15/5) und die Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4. Abbildung 47 gibt die hierbei erzielte Trennung wieder.

Im DC-Bild des ätherischen Öles von H. inuloides bestimmen sechs Zonen das Chromatogramm (s. Abb. 47). Besonders charakteristisch sind die starke, rotviolette Zone von Caryophyllenoxid (Nr. 2, R_f 0,76) und die blauviolette Zone von 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Nr. 3, R_f 0,62). Cadalin und Calacoren, zwei weitere identifizierte Hauptkomponenten, befinden sich in den an der Lösungsmittelfront auftretenden, nicht getrennten Terpenkohlenwasserstoffen (Nr. 1). 4-Methoxyisocadalin ist direkt unter den Terpenkohlenwasserstoffen lokalisiert, färbt sich jedoch mit Anisaldehyd/H_2SO_4 kaum an. Das identifizierte 7-Hydroxycadalin erscheint bei R_f 0,56 unterhalb der Zone von 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Nr. 4) als leicht braune Zone, die allerdings erst bei längerem Liegenlassen der besprühten Platte erscheint und deshalb im wiedergegebenen DC-Bild nicht zu erkennen ist. Bei weiteren braungrünlichen bis braunvioletten Zonen bei R_f 0,52, 0,45, 0,42, 0,37 und 0,34 dürfte es sich um Gemische nicht identi-

Abb. 47: DC-Vergleich des ätherischen Öles und des Petroletherextraktes der Blütenkörbchen von H. inuloides A. montana
DC-System 1; Detektion: Anisaldehyd/H_2SO_4
1 : Terpenkohlenwasserstoffe (vor allem Cadalin und Calacoren, dicht unterhalb davon 4-Methoxyisocadalin, mit Anisaldehyd/H_2SO_4 kaum detektierbar)
2 : Caryophyllenoxid
3 : 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin
4 : 7-Hydroxycadalin
5 : 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon
6 : Δ7-Sterine

fizierter, sauerstoffhaltiger Sesquiterpene handeln, da außer den genannten Verbindungen keine weiteren Hauptkomponenten gc im ätherischen Öl nachzuweisen sind (s. Abb. 32, S. 54).

Im DC-Bild des ätherischen Öles der A. montana-Blüten treten bei R_f 0,88 und 0,67 zwei gelb-orange Zonen auf, die bei H. inuloides fehlen und deshalb zur sicheren Unterscheidung der beiden Öle herangezogen werden können. Im gesamten Chromatogramm treten hier nach Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 keine blau- oder rotviolett gefärbten Komponenten auf, mit Ausnahme einer schwachen Zone auf der Höhe von Caryophyllenoxid, die sich wie dieses rotviolett färbt. Die beiden Blütendrogen lassen sich somit anhand des DC der ätherischen Öle sicher unterscheiden.

Eine schnellere und ebenfalls sichere Unterscheidung der beiden Blütendrogen ist durch die dc Auftrennung des Petroletherextraktes möglich. Auch hier dominieren bei H. inuloides die Zonen von Caryophyllenoxid und 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin, während bei A. montana eine unterhalb der letzteren Verbindung auftretende Zone zweier nur wenig getrennter Komponenten (R_f 0,58 und 0,55) das Chromatogramm bestimmt. Gut geeignet für eine Unterscheidung ist weiterhin das bei H. inuloides auftretende 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon (R_f 0,35), das bei A. montana fehlt, sowie die relativ starke graubraun gefärbte Zone der Δ7-Sterine.

4.8. Identifizierung von Caryophyllenoxid in A. montana-Blüten

Sowohl im ätherischen Öl als auch im Petroletherextrakt der A. montana-Blüten war im DC auf der Höhe von Caryophyllenoxid eine schwache Zone nachweisbar, die auf das Vorliegen dieser

Verbindung hindeutete (s. Abb. 47), die bisher für A. montana-Blüten noch nicht beschrieben worden ist. Zu ihrer weiteren Identifizierung wurde der Petroletherextrakt sc an Kieselgel aufgetrennt (s. Kap. 7.13.3.) und die entsprechende Teilfraktion gc und durch gekoppelte GC/MS-Analyse untersucht. Die Retentionszeit und das MS stimmten mit den entsprechenden Werten der Vergleichssubstanz Caryophyllenoxid überein, so daß dieses Sesquiterpen auch Inhaltsstoff der A. montana-Blüten ist.

5. Diskussion

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, werden die Blütenkörbchen der Asteraceae Heterotheca inuloides Cass. (Tribus Astereae) in Mexiko unter dem Namen „Arnica" volksmedizinisch in gleicher Weise genutzt wie die der europäischen Arnica montana L. (Tribus Heliantheae), die als „Arnicae flos" im DAB 8 und mehreren anderen Arzneibüchern geführt werden. Über die volksmedizinische Verwendung hinaus haben die „Heterothecae flos" als derzeit häufigste Verfälschung der offizinellen Arnikablüten auf dem europäischen Drogenmarkt großes Interesse gewonnen. Sie werden hier in großem Umfang unter der Bezeichnung „Flores Arnicae, mexikanisch" angeboten. Dies macht ihre sichere Identifizierung anhand von morphologisch-anatomischen als auch chemischen Merkmalen erforderlich.

Eine ausführliche morphologische und anatomische Beschreibung der Heterothecae flos lag in der Literatur nicht vor. Lediglich von Willuhn und Röttger [4] wurden im Rahmen ihrer Untersuchungen zur Identifizierung der bis dahin unbekannten Stammpflanze der „mexikanischen Arnikablüten" einige wichtige Unterscheidungsmerkmale aus diesem Bereich angegeben. Die in der vorliegenden Arbeit erstmals erfolgte morphologisch-anatomische Gesamtbeschreibung der Droge führte zum Auffinden einer Reihe weiterer diagnostisch wertvoller Merkmale, die zur Differenzierung von den offizinellen Arnikablüten herangezogen werden können (s. Tab. 1, S. 11 und 12). Dadurch ist zukünftig eine sichere Identifizierung der Droge auf mikroskopischem Wege möglich. Unter Bezug auf die Untersuchungen von Willuhn und Röttger [4] wurde unabhängig von uns eine

vergleichende morphologisch-anatomische Untersuchung der Blütenkörbchen von H. inuloides und A. montana auch von Saukel [75] durchgeführt, die nach Abschluß unserer eigenen Untersuchungen im April dieses Jahres erschien und unsere Ergebnisse bestätigt.

Von der chemischen Seite her konnten Willuhn und Röttger [4] durch DC-Analyse zeigen, daß in den „Mexikanischen Arnikablüten" die als wesentliche Wirkstoffe der offizinellen Droge anzusehenden Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester [82, 83] nicht auftreten. Aufgrund dieser Untersuchungen kommen als potentielle Wirkstoffe das ätherische Öl und die Flavonoide der Droge in Betracht, deren Gehalt von den Autoren mit 0,44 % bzw. 0,73 % bestimmt wurde, und die als Nebenwirkstoffe auch für die Arnikablüten diskutiert werden [84]. Die in der vorliegenden Untersuchung an der Handelsdroge durchgeführte Bestimmung des Gehaltes an ätherischem Öl der Heterothecae flos ergab mit 0,25 % einen deutlich niedrigeren Wert. Ursache hierfür dürften vermutlich unterschiedliche Lagerungszeiten der jeweils untersuchten Blütendroge sein, die bei Drogen mit ätherischem Öl bereits nach wenigen Monaten zu erheblichen Ölverlusten führen können [u.a. 85,86,87]. Es wäre deshalb wünschenswert, den tatsächlich erreichbaren Ölgehalt der Heterothecae flos an frischer, nicht gelagerter Droge zu bestimmen.

Das abgetrennte ätherische Öl ist im Gegensatz zu dem der A. montana-Blüten bei Zimmertemperatur flüssig. Die Ursache hierfür ist der wesentlich geringere Gehalt an freien Fettsäuren im Öl, deren Anteil nach Abtrennung mit ca. 17 % ermittelt wurde (Arnikablütenöl ca. 45 % s. [88]). Als Haupt-

komponente des gc identifizierten Fettsäuregemisches tritt auch hier Palmitinsäure auf (s. Abb. 31, S. 51).

Die Charakterisierung des ätherischen Öles über seine physikalischen und chemischen Kennzahlen sowie durch die dünnschicht- und gaschromatographische Auftrennung ergab, daß es bereits hierüber deutlich vom ätherischen Öl der A. montana-Blüten unterschieden werden kann (s. Tab. 2, S. 19 und Abb. 47, S. 89 bzw. Abb. 12, S. 20). Aufgrund der durchgeführten GC-Analyse setzt sich das Öl aus über 100 Komponenten zusammen, unter denen, anders als im A. montana-Öl, nur fünf Verbindungen als Hauptkomponenten im Gaschromatogramm dominieren (s. Abb. 12, S. 20). Drei dieser Hauptkomponenten sowie eine weitere Verbindung wurden isoliert und auf spektroskopischem Wege (IR, MS, ^{1}H-NMR) als Cadalin, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 4-Methoxyisocadalin sowie 7-Hydroxycadalin identifiziert.

Das natürliche Vorkommen von 4-Methoxyisocadalin, dessen Sesquiterpengrundgerüst biogenetisch irregulär gebaut ist, wurde bisher nur für die Wurzeln und das Kraut (ohne Angabe, ob dieses auch Blüten enthielt) von H. inuloides beschrieben und sonst anderweitig noch nicht gefunden. 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin ist ebenfalls ein Inhaltsstoff des Krautes von H. inuloides [13] und ist ansonsten nur noch aus anderen Heterotheca-Arten (H. subaxillaris, H. grandiflora) isoliert worden [55,76]. Bei Cadalin, 7-Hydroxycadalin und den beiden weiteren durch dc, gc und GC/MS-Analyse als Caryophyllenoxid und Calacoren identifizierten Hauptkomponenten handelt es sich dagegen um im Pflanzenreich weit verbreitet vorkommende Sesquiterpenderivate [u.a. 19,23,37,39,50].

Insgesamt dominieren im ätherischen Öl Sesquiterpene. Monoterpene und Phenylpropane kommen vergleichsweise nur in Spuren vor. Durch GC- und GC/MS-Analyse konnten 12 weitere Terpenkohlenwasserstoffe (s. Tab. 4, S. 30), neun sauerstoffhaltige Terpene sowie Eugenol, Benzaldehyd und Benzylalkohol (s. Tab. 9, S. 48) als Bestandteile des Öls und damit erstmals als Inhaltsstoffe der Blüten von H. inuloides identifiziert werden. Der Anteil der insgesamt identifizierten Verbindungen an der quantitativen Zusammensetzung des Öls beträgt etwa 70 %. Die im Blütenöl von A. montana auftretenden Thymolether und -ester [89] kommen bei H. inuloides nicht vor.

In dem zum Vergleich aus A. montana-Blüten abgetrennten ätherischem Öl wurden durch GC- und GC/MS-Analyse einige bisher für diese Droge noch nicht beschriebene Inhaltsstoffe identifiziert. Es handelt sich bei ihnen um α-Phellandren, Myrcen, p-Cymen, β-trans-Farnesen, δ-Cadinen und Caryophyllenoxid. Über das Vorkommen von Cadinen in A. montana-Blüten ist bereits von Góra et al. [90] berichtet worden, ohne daß die Autoren Angaben darüber machen, um welches der bekannten Isomere es sich dabei handelt.

Nach den bereits aus dem ätherischen Öl isolierten Cadinen-Derivaten wurden aus dem Petroletherextrakt der Blütenkörbchen mit 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon und 2,3-Epoxy-7-hydroxy-ß-calacoren zwei weitere Verbindungen dieser Stoffklasse isoliert. Die erste Verbindung wurde bereits von Bohlmann et al. [13,76] als Inhaltsstoff des Krautes von H. inuloides und H. subaxillaris beschrieben. Bei 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren handelt es sich um einen

neuen Naturstoff. Bekannt ist 7-Hydroxy-β-calacoren als Inhaltsstoff von H. grandiflora [55].

Insgesamt wurden bisher vier Arten der Gattung Heterotheca chemisch analysiert [13,55,76,77]. Danach scheint diese Gattung insbesondere durch Cadinen- und Isocadinenderivate charakterisiert zu sein, die anderweitig bisher noch nicht im Pflanzenreich gefunden worden sind. Untersuchungen zur biologischen oder pharmakologischen Wirksamkeit dieser Verbindungstypen liegen noch nicht vor.

Als weitere Inhaltsstoffe des Petroletherextraktes der Blüten von H. inuloides wurden erstmals die Triterpene und die Sterine einer Heterotheca-Art analysiert. Insgesamt wurden zehn frei vorliegende Triterpene nachgewiesen. Hauptkomponente ist das ubiquitär vorkommende pentacyclische α-Amyrin neben geringen Mengen β-Amyrin. Zwei weitere pentacyclische Triterpene besitzen wahrscheinlich eine Lupen-Struktur, ein anderes ein Baueren-Grundgerüst. Die in A. montana-Blüten auftretenden Taraxasterole [91] konnten nicht nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren identifizierten Triterpenen handelt es sich um die tetracyclischen Verbindungen Cycloartenol und Lanosterin, von denen letzteres nur in Spuren vorkommt. Diese beiden Triterpene sind die direkten Cyclisierungsprodukte von 2,3-Epoxysqualen und die biosynthetischen Vorstufen der Sterine [92].

Hervorzuheben ist das Auftreten von Lanosterin, das in der Familie der Asteraceae erst einmal (Senecio burchelli [93]) nachgewiesen worden ist. Dieses Triterpen ist die biogenetische Vorstufe der Sterine im tierischen Organismus und in den photosynthetisch inaktiven Pilzen [94]. Es konnte lange

Zeit in photosynthetisch aktiven Pflanzen nicht nachgewiesen werden, so daß bei diesen Cycloartenol als alleinige Vorstufe der Sterine galt. In den letzten Jahren ist Lanosterin jedoch verschiedentlich auch in höheren Pflanzen gefunden worden, doch es wird im Gegensatz zu Cycloartenol nicht von allen höheren Pflanzen gebildet [95]. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in einigen höheren Pflanzen neben dem Hauptweg über Cycloartenol ein weiterer Weg der Sterinbiosynthese auch über Lanosterin laufen kann [vgl. hierzu 96,97]. Nicht geklärt ist, ob Lanosterin hier direkt aus 2,3-Epoxysqualen entsteht oder aus Cycloartenol hervorgeht [93,96,100].

Interessant ist weiterhin, daß die Hauptmenge der in den Blüten von H. inuloides frei vorliegenden Sterine von Δ7-Sterinen gebildet wird, die als ein Gemisch aus α-Spinasterol, 24-Methylcholest-7-enol, Δ7-Stigmasterol und Δ7-Avenasterol identifiziert wurden. Sie sind die Biosynthesevorstufen der üblicherweise in den Pflanzen dominierenden Δ5-Sterine, die hier vergleichsweise nur in Spuren auftreten. Es handelt sich bei ihnen um ein Gemisch aus Cholesterol, Campesterol sowie Stigmasterol und Sitosterol als Hauptkomponenten. Als weiteres Sterin wurde das gesättigte Stigmastanol identifiziert. In den Blüten von A. montana ist bisher nur Sitosterol identifiziert worden [91], das Vorkommen von weiteren Δ5-, Δ5,22- und Δ7-Sterinen jedoch nachgewiesen, ohne diese im Einzelnen zu identifizieren [98].

Das Komponentenspektrum des Petroletherextraktes der Heterothecae flos unterscheidet sich deutlich von dem der Arnikablüten, so daß die dc Auftrennung eines Petroletherauszugs der Blütendrogen für ihre sichere Unterscheidung geeignet

ist (s. Abb. 47, S. 89). Diese Methode ergänzt die von Willuhn et al. [99] vorgeschlagene Identitätsprüfung der offizinellen Arnikablüten anhand ihrer Sesquiterpenlactone und Flavonoide, da bei Vorliegen einer Verfälschung diese hierüber gegebenenfalls sicher als Heterothecae flos identifiziert werden kann.

Die durchgeführte Analyse der lipophilen Bestandteile der „Mexikanischen Arnikablüten" hat gezeigt, daß sowohl bei der Zusammensetzung des ätherischen Öles als auch bei weiteren lipophilen Komponenten keine Ähnlichkeit mit den offizinellen Arnikablüten gegeben ist, so daß von diesen Inhaltsstoffen her keine arnikaähnliche Wirkungen abzuleiten sind. Da von der volksmedizinisch mit gleicher Indikationsstellung genutzten mexikanischen Droge, anders als bei den Arnikablüten, keine tierexperimentellen oder andere pharmakologischen Untersuchungen vorliegen, bleibt abzuwarten, ob den „Mexikanischen Arnikablüten" in den betreffenden Indikationsgebieten überhaupt eine Wirkung zukommt.

6. Zusammenfassung

1. Das ätherische Öl der in Mexiko volksmedizinisch unter dem Namen „Arnica" verwendeten Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides Cass. (Asteraceae), die als Verfälschung der offizinellen Arnikablüten derzeit auf dem europäischen Drogenmarkt auftreten, wurde durch seine physikalischen und chemischen Kennzahlen charakterisiert und seine chemische Zusammensetzung analysiert. Das in Mengen von 0,25 % aus der Droge abgetrennte ätherische Öl setzt sich nach der präparativen Auftrennung aus Fettsäuren (ca. 18 %), phenolischen Verbindungen (ca. 8 %), Terpenkohlenwasserstoffen (ca. 26 %) und aus einem vorwiegend von sauerstoffhaltigen Sesquiterpenen gebildeten Restöl zusammen.

2. Nach der durchgeführten GC-Analyse bilden fünf Verbindungen die Hauptkomponenten des Öles. Sie wurden durch GC- und gekoppelte GC/MS-Analyse bzw. nach ihrer Isolierung auf spektroskopischem Wege (IR, ^{1}H-NMR) als Cadalin, 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin, 4-Methoxyisocadalin, Caryophyllenoxid und Calacoren identifiziert (s. Abb. 32, S. 54). Als weiteres Cadinenderivat wurde aus dem Öl 7-Hydroxycadalin isoliert und spektroskopisch identifiziert.

3. Durch GC- und gekoppelte GC/MS-Analyse wurden in der Fraktion der abgetrennten Terpenkohlenwasserstoffe 11 weitere Verbindungen identifiziert. Es sind dies die Monoterpenkohlenwasserstoffe β-Pinen, Myrcen, p-Cymen, β-Phellandren und α,p-Dimethylstyren sowie die Sesquiterpenkohlenwasserstoffe β-Bourbonen, β-Caryophyllen, α-Bergamoten, γ-Muurolen, α-Curcumen und δ-Cadinen.

In der Fraktion der sauerstoffhaltigen Komponenten des ätherischen Öles wurden über die genannten Hauptkomponenten hinaus durch GC- und gekoppelte GC/MS-Analyse 11 weitere Verbindungen identifiziert und zwar die Monoterpene Linalool, α-Terpineol, Borneol, Bornylacetat, Carvon, Menthon und 1-p-Menthen-9-al, die Phenylpropane Anethol und Eugenol sowie Benzaldehyd und Benzylalkohol. Der Anteil der identifizierten Verbindungen an der Gesamtzusammensetzung des ätherischen Öles beträgt etwa 70 %.

4. Bei den im ätherischen Öl auftretenden Fettsäuren handelt es sich vorwiegend um Palmitinsäure. In Spuren treten Myristinsäure, Pentadecansäure, Stearinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure und Linolsäure auf.

5. Aus dem Petroletherextrakt der Heterothecae flos wurden neben den bereits aus dem Öl isolierten Cadinenderivaten als weitere Verbindungen dieser Stoffgruppe 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon und 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren isoliert und mit spektroskopischen Methoden identifiziert. Bei der Epoxy-Verbindung handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

6. Die frei vorliegenden Triterpene und Sterine wurden isoliert und durch GC- und gekoppelte GC/MS-Analyse identifiziert. Danach führen die Heterothecae flos die pentacyclischen Triterpene α-Amyrin (Hauptkomponente) und β-Amyrin. Zwei weitere pentacyclische Triterpene besitzen wahrscheinlich eine Lupen-, ein anderes eine Bauren-Struktur. Weiterhin wurden Cycloartenol und Lanosterol identifiziert.

   Bei den frei vorliegenden Sterinen handelt es sich über-

wiegend um Δ7-Sterine mit α-Spinasterol als Hauptkomponente neben 24-Methylcholest-7-enol, Δ7-Stigmastenol und Δ7-Avenasterol. Δ5-Sterine kommen nur in Spuren vor und bilden ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und β-Sitosterin. Als weiteres Sterin wurde Stigmastanol nachgewiesen.

7. Als für die Blüten von Arnica montana bisher nicht beschriebene Inhaltsstoffe wurden im ätherischen Öl der offizinellen Droge α-Phellandren, Myrcen, p-Cymen, β-trans-Farnesen, Humulen, δ-Cadinen und Caryophyllenoxid nachgewiesen.

8. Zur sicheren Unterscheidung der offizinellen Arnikablüten von den als Verfälschung auftretenden Heterothecae flos wird die Dünnschichtchromatographie eines Petroletherauszuges der Blütenkörbchen vorgeschlagen.

7. Experimenteller Teil

7.1. Herkunft der Droge

Die Blütenkörbchen von Heterotheca inuloides Cass. wurden unter der Bezeichnung „Mexikanische Arnikablüten" von der Firma Caesar und Loretz, Hilden/Rhld., bezogen.

7.2. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Firma BECKMAN bei Zimmertemperatur in Hexan (Uvasol).

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 297 der Firma PERKIN-ELMER in KBr (Preßlinge) oder als Film zwischen KBr-Platten, die Massenspektren mit dem Massenspektrometer VARIAN MAT CH 7 A unter GC/MS-Kopplung aufgenommen.*)

Die ^{1}H-NMR-Spektren**) wurden mit dem VARIAN-Spektrometer CFT (80 MHz) oder mit dem Spektrometer WH-360 bzw. WM-400

---

*) Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich sehr für die Aufnahme der Massenspektren.

**) Herrn Dr. H.-J. Hemmerling, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Aufnahme der 80 MHz-Spektren, Herrn Prof. Dr. H. Bornowski, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin, für die Aufnahme der 400 MHz-Spektren und Herrn Dr. D. Wendisch, BAYER AG Leverkusen, für die 360 MHz-Spektren sowie für seine Hilfe bei der Interpretation.

der Firma BRUCKER-PHYSIK aufgenommen. Als Lösungsmittel diente, soweit nichts anderes angegeben ist, Deuterochloroform, als innerer Standard TMS.

7.3. Bestimmung der physikalischen Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch LEITZ Typ 350 bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit dem Polarimeter 243 der Firma PERKIN-ELMER bei 20° C in Benzol (Uvasol).

Der Brechungsindex des ätherischen Öles wurde mit dem Abbé-Refraktometer der Firma ZEISS bei 20° C, die Dichte mit dem Krutzschmeter der Firma PETZOLD bestimmt.

7.4. Bestimmung der chemischen Kennzahlen

Zur Bestimmung der Säurezahl kleiner Ölmengen wurde die Vorschrift der Ph. Eur. III abgewandelt. Jeweils 60 - 100 mg ätherisches Öl wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml einer zuvor gegen Phenolphthalein neutralisierten Mischung gleicher Teile Ether und Alkohol (96 %) versetzt und mit 0,02 N ethanolischer Kalilauge aus einer 1 ml Bürette bis zur Rosafärbung titriert. Es wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt. Die Säurezahl wurde nach der Formel

$$\text{Säurezahl} = \frac{a \times 5{,}61}{e \times 5}$$

errechnet (a = ml Verbrauch an 0,02 N ethanolischer Kalilauge, e = Einwaage in Gramm).

Zur Bestimmung der Verseifungszahl kleiner Ölmengen wurde ebenfalls die Vorschrift der Ph. Eur. III modifiziert. Jeweils 100 - 150 mg ätherisches Öl wurden in einem 30 ml Spitzkolben mit 10,00 ml 0,1 N ethanolischer Kalilauge versetzt und unter Rückfluß 2 Std. lang auf dem Wasserbad erhitzt. Die heiße Lösung wurde anschließend mit 0,1 N Salzsäure gegen Phenolphthalein titriert. Es wurden drei Parallelbestimmungen und ein Blindversuch durchgeführt. Die Verseifungszahl wurde nach der Formel

$$\text{Verseifungszahl} = \frac{(b - a) \times 28{,}05}{5 \quad x \quad e}$$

errechnet (a = ml Verbrauch an 0,1 N Salzsäure im Hauptversuch, b = ml Versuch an 0,1 N Salzsäure im Blindversuch, e = Einwaage in Gramm).

Die Bestimmung der Jodzahl erfolgte nach der Vorschrift der Ph. Eur. III mit 150 - 200 mg ätherischen Öles.

7.5. Chromatographische Methoden

7.5.1. Dünnschichtchromatographie

Für die analytische DC wurden Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten (MERCK) verwendet. Die Laufstrecke betrug in der Regel 15 cm bei Kammersättigung. Die Verhältnisangaben bei den Fließmittelgemischen beziehen sich jeweils auf Volumenteile.

Fließmittel:

System 1: Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80/15/5)

Dieses Fließmittelsystem diente als Standardsystem bei der Auftrennung des ätherischen Öles und des Petroletherextraktes.

System 2: Hexan/Benzol (1/1)

Dieses Fließmittelgemisch wurde zur Trennung der Triterpenacetate auf mit $AgNO_3$ imprägnierten Kieselgelfolien verwendet.

System 3: Petrolether/Ether (1/1)

System 4: Petrolether/Ethylacetat (6/4)

System 5: Dichlormethan

System 6: Chloroform/Ethylacetat/Ameisensäure (90/10/2)

System 7: Chloroform/Hexan (7/3)

System 8: Pentan/Ether (9/1)

Detektionsreagenzien:

1. Anisaldehyd/H_2SO_4 [78]

   1 ml Anisaldehyd + 97 ml Essigsäure (99 - 100 %) + 2 ml H_2SO_4 (95 - 97 %)

   Nach dem Besprühen wird die Platte bis zur Farbdifferenzierung auf 110° C erhitzt (ca. 5 - 10 Min.).

2. Echtblausalz B

   Frisch bereitete 0,5 %-ige wäßrige Echtblausalz B-Lösung. Dieses Reagenz dient zum Nachweis von phenolischen Verbindungen.

3. Pikrinsäure (modifiziert nach Fioritti u. Sims) [79]

   Lösung 1: 0,05 M Pikrinsäure in Ethanol (95 %)

   Lösung 2: Ether/Ethanol 95 %-ig/Eisessig (80/20/1)

   Lösung 3: Ammoniaklösung 25 %-ig

   Nach Besprühen mit der Pikrinsäurelösung wird die Platte erhitzt (110° C, ca. 3 - 5 Min.), danach 30 Min. lang in einer Kammer den Dämpfen von Lösung 2 ausgesetzt und anschließend 2 Min. lang den Dämpfen von Lösung 3.

   Epoxide ergeben gelb-orange bis braun gefärbte Reaktions-

produkte auf gelbem Grund.

4. Molybdatophosphorsäure-Reagenz

   Gleiche Anteile konz. Schwefelsäure und konz. Phosphorsäure + 10 % H_2O + 2 % Phosphormolybdänsäure.

   Nach Erhitzen der besprühten Platten auf 110° C für 5 Min. färben sich Δ5-Sterine rötlich, mit Obergang zu blauviolett, Δ7-Sterine und Triterpene braun bis braunviolett.

5. Liebermann-Burchard-Reagenz

   Acetanhydrid/konz. Schwefelsäure (10/1)

   Nach Besprühen und Erhitzen auf 110° C für 3 - 4 Min. reagieren Δ5-Sterine unter Rotviolettfärbung mit Obergang nach blaugrün, Δ7-Sterine und die Triterpene unter Braun- bis Braunviolettfärbung.

6. Pyranin

   0,015 %-ige wäßrige Lösung von Pyranin (3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium, BAYER Leverkusen)

   Der Fluoreszenzindikator dient zum Nachweis von Fettsäuren. Im UV-Licht bei 366 nm zeigen die Fettsäuren eine hellblaue Fluoreszenz auf gelblichgrünem Grund.

7.5.2. Säulenchromatographie

Als Sorbentien für die säulenchromatographische Auftrennung des ätherischen Öles und des Petroletherextraktes wurden Kieselgel 60 (70 - 230 mesh und 230 - 400 mesh, MERCK) sowie Silica WOELM TSC verwendet. Die Säulenfüllung erfolgte durch Einschlämmen des Adsorbens. Das zu trennende Substanzgemisch wurde an Trägermaterial (1/1) adsorbiert auf die Säule gegegeben und mit wenig Seesand p.a. abgedeckt.

7.5.3. Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie

Zur Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie wurde die Duramat Dosierpumpe der Firma CHEMIE UND FILTER verwendet. Als Trennsäulen dienten Lobar-Fertigsäulen der Größen A und B (MERCK), gefüllt mit LiChroprep Si 60 und selbstgefüllte Säulen unterschiedlicher Länge der Firma ALTEX (Ø 6 mm, 15 mm und 25 mm).

7.5.4. Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Für die HPLC standen folgende Geräte zur Verfügung:

1. Präparatives HPLC-Gerät 830 der Firma DUPONT mit UV-Spektralphotometer 837 und Strip chart recorder 7130 der Firma HEWLETT-PACKARD
2. Pumpenstand Serie 2/2 der Firma PERKIN-ELMER mit UV-Spektralphotometer LC 75 und Recorder 561

Als Trennsysteme wurden verwendet:

System 1: Säule ZORBAX-Sil, 21,2 mm x 25 cm (DUPONT)
mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol (99/1) (G/G)

System 2: Säule ZORBAX-C-8, 9,4 mm x 25 cm (DUPONT)
mobile Phase: Methanol/Wasser (85/15) (G/G) mit Zusatz von 1 g $AgNO_3$ pro Liter

7.5.5. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 der Firma PERKIN-ELMER mit FID und Recorder 56 sowie der Gaschromatograph 5710 A der Firma HEWLETT-PACKARD mit FID und Strip chart recorder 7123 A. Als Trägergas diente Stickstoff.

System 1: Quarzkapillarsäule FS-OV-101, 25 m (MACHEREY & NAGEL); Temperaturprogramm 100 - 250° C (2 Min. bei 100° C, Anstiegrate 4° C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektor- und Detektortemperatur: 250° C

System 2: Säule wie bei System 1; Temperaturprogramm 80 - 250° C (2 Min. bei 80° C, Anstiegrate 4° C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektortemperatur: 200° C; Detektortemperatur: 250° C

System 3: Säule wie bei System 1; Temperaturprogramm 150 - 250° C (Anstiegrate 10° C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektor- und Detektortemperatur: 250° C

System 4: Säule wie bei System 1; Temperaturprogramm 120 - 250° C (2 Min. bei 120° C, Anstiegrate 10° C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektor- und Detektortemperatur: 250° C

System 5: Quarzkapillarsäule FS-CW-20M, 25 m (MACHEREY & NAGEL); Temperaturprogramm 80 - 200° C (2 Min. bei 80° C, Anstiegrate 4° C/Min.); Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektor- und Detektortemperatur: 200° C

System 6: Quarzkapillarsäule FS-OV-1, 25 m (MACHEREY & NAGEL); Säulentemperatur 250° C; Stickstoff 1,2 bar; Split 1 : 50; Injektor- und Detektortemperatur: 300° C

7.6. Derivatisierungen

7.6.1. Bildung der Acetate

50 mg der entsprechenden Substanz wurden in einer Mischung von 1,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurden die Acetate 5 mal mit jeweils 5 ml Petrolether (40 - 60° C) ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde das Lösungsmittel am Rotavapor abgezogen. Notwendige Reinigungen erfolgten durch Umkristallisation oder durch Säulenchromatographie an Kieselgel.

7.6.2. Bildung der Fettsäuremethylester

Einige mg der Fettsäuren wurden in wenig Ether gelöst und mit einem Oberschuß an etherischer Diazomethanlösung (bleibende Gelbfärbung) versetzt. Nach 24 Std. wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen.

Zur Herstellung der etherischen Diazomethanlösung wurden 10 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (MERCK) in 100 ml Ether gegeben. Die mit einer Kältemischung (ca. - 15° C) kühl gehaltene Lösung wurde in kleinen Anteilen mit 70 ml 0,75 N ethanolischer Natronlauge versetzt, wobei die Temperatur unter - 5° C gehalten wurde. Nach 10 Min. wurde die etherische Diazomethanlösung in eine gekühlte Vorlage überdestilliert. Die Lösung bleibt bei kühler Aufbewahrung mehrere Tage gebrauchsfertig.

7.7. Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles

Der Gehalt an ätherischem Öl wurde mit 10 g gepulverter Droge analog zu den Bestimmungen an Flores Arnicae [80,81] gravimetrisch mit der „Karlsruher Apparatur" nach Stahl bestimmt.

Zur Gewinnung größerer Mengen ätherischen Öles für die chemische Analyse wurden jeweils 200 g Droge unter Zusatz von 3 l Wasser in einem 6 l Kolben mit einer vergrößerten Karlsruher Apparatur für 6 Stunden destilliert.

7.8. Fraktionierung des ätherischen Öles

Das ätherische Öl wurde nach zwei verschiedenen Methoden fraktioniert:

Methode A:

2 g ätherisches Öl wurden an 100 g Kieselgel 60 (70 - 230 mesh, MERCK) sc (Ø 20 mm, Länge 100 cm mit Kühlmantel) getrennt. Das Adsorbens wurde zuvor mit HCl und Ammoniak behandelt, jeweils mit Wasser neutralgewaschen, getrocknet und auf einen Wassergehalt von 7 % eingestellt [14,15]. Zur Abtrennung der Kohlenwasserstoffe wurde mit n-Pentan eluiert: 480 mg (= 24 %).

Die auf der Säule verbliebenen sauerstoffhaltigen Verbindungen wurden mit Ether von der Säule gewaschen und der Ether im Vakuum abgezogen: 1,374 g (= 68,7 %) Verlust: 146 mg (= 7,3 %). Diese Fraktion wurde erneut sc an Kieselgel mit Pentan/Ether-Gemischen (Erhöhung des Etheranteils um jeweils 10 % nach 200 ml) aufgetrennt. Nach dc und gc Kontrolle wurde das Eluat zu sechs Fraktionen vereinigt (s. Tab. 16, S. 111).

Tab. 16: Säulenchromatographische Fraktionierung des ätherischen Öles (2 g) an Kieselgel 60 mit n-Pentan und n-Pentan/Ether-Gemischen

Fraktion	Elutionsmittel	Gewicht
Kohlenwasserstoffe	550 ml n-Pentan	480 mg
0/1	100 ml n-Pentan/Ether 9/1	125 mg
0/2	100 ml n-Pentan/Ether 9/1 200 ml n-Pentan/Ether 8/2	250 mg
0/3	200 ml n-Pentan/Ether 7/3 100 ml n-Pentan/Ether 6/4	395 mg
0/4	100 ml n-Pentan/Ether 6/4 200 ml n-Pentan/Ether 5/5 200 ml n-Pentan/Ether 4/6	238 mg
0/5	200 ml n-Pentan/Ether 3/7 200 ml n-Pentan/Ether 2/8 100 ml n-Pentan/Ether 1/9	132 mg
0/6	100 ml n-Pentan/Ether 1/9 300 ml Ether	234 mg

Verlust: 146 mg (= 7,3 %)

Methode B:

4 g ätherisches Öl wurden in 200 ml n-Pentan gelöst. Zur Abtrennung der Fettsäuren wurde die Pentanlösung viermal mit jeweils 100 ml 5 %-iger Natriumcarbonatlösung und anschließend zweimal mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten Ausschüttelungen wurden nach Ansäuern mit verdünnter Salz-

säure mehrmals mit Ether ausgeschüttelt, dieser über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur abgedampft. Rückstand: 0,714 g Fettsäuren (= 17,85 %)

Zur Abtrennung der Phenole wurde die Pentanlösung anschließend dreimal mit jeweils 100 ml 5 %-iger Natronlauge und zweimal mit je 100 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zur Reinigung zweimal mit jeweils 50 ml Petrolether (40 - 60°) ausgeschüttelt, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und fünfmal mit 100 ml Ether extrahiert. Die Etherphase wurde über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum eingedampft. Rückstand: 0,323 g Phenole (= 8,08 %)

Nach Trocknen der Pentanlösung über Na_2SO_4 sicc. wurde diese im Vakuum auf 3 - 4 ml eingeengt, auf eine Kieselgel 60-Säule gegeben und wie bei Methode A die Kohlenwasserstoffe abgetrennt: 1,032 g (= 25,80 %)

Die sauerstoffhaltigen Verbindungen wurden ohne weitere Auftrennung mit Ether von der Säule eluiert: 1,721 g (= 43,03 %)

Verlust bei der erfolgten Trennung: 0,210 g (= 5,25 %)

7.9. Cadalin (Verbindung I)

Die Kohlenwasserstoff-Fraktion des ätherischen Öles (480 mg; Methode A; s. S. 110) wurde in vier Anteilen von jeweils 120 mg durch Niederdruck-Flüssigchromatographie an einer Altex-Säule (Ø 6 mm) an 20 g Kieselgel 60 (70 - 230 mesh, MERCK), imprägniert mit ca. 20 % $AgNO_3$, aufgetrennt. Eluiert wurde jeweils mit 100 ml n-Pentan, 50 ml n-Pentan/Ether (8/2), 50 ml n-Pentan/Ether (1/1) und 100 ml Ether. Das aufgefangene Eluat wurde nach gc Kontrolle in System 1 zu drei

Fraktionen vereinigt (Fr. 1: 125 mg; Fr. 2: 198 mg; Fr. 3: 117 mg).

Fraktion 2 enthielt die Hauptkomponente. Diese wurde durch präparative HPLC in System 2 isoliert: 33 mg leicht gelbliches Öl, gc-rein

IR (Film auf KBr), cm^{-1}: 1625, 1600, 1510 (Aromat); 1380, 1360 (Isopropylgruppe)

UV (Hexan) λ max: 290, 232 nm

MS: m/z 198 (M^+; 78 %), 184 (35), 183 (100), 168 (83), 167 (32), 165 (28), 155 (18), 153 (38), 152 (23), 141 (11), 128 (9), 115 (8), 99 (7), 93 (10), 92 (9), 90 (8), 85 (9), 84 (11), 83 (17)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm): s. Tab. 3, S. 25

7.10. 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Verbindung XXI) und 7-Hydroxycadalin (Verbindung XXII)

315 mg der Fraktion O/3 (s. Tab. 16, S. 111) wurden durch präparative HPLC in System 1 aufgetrennt. Es wurden zwei Substanzen kristallin gewonnen: 10 mg 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 4,5 mg 7-Hydroxycadalin

7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Verbindung XXI)

Farblose Kristallnadeln; Smp.: 102 - 103° C

IR (KBr), cm^{-1}: 3340 (OH-Gruppe); 1620, 1585, 1505 (Aromat); 1380, 1360 (Isopropylgruppe)

UV (Hexan) λ max: 332, (312), 300, (274), 264, 222 nm

MS: m/z 216 (M^+; 28 %), 199 (4), 174 (36), 173 (100), 172 (34), 171 (8), 159 (11), 158 (82), 157 (20), 155 (25), 145 (43), 143 (6), 130 (8), 129 (21), 128 (22), 127 (6), 115 (13), 105 (5), 91 (7), 43 (33)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm): s. Tab. 6, S. 37

7-Hydroxycadalin (Verbindung XXII)

Farblose Kristallnadeln; Smp.: 118 - 119° C

IR (KBr), cm^{-1}: 3330 (OH-Gruppe); 1628, 1605, 1530 (Aromat); 1380, 1360 (Isopropylgruppe)

UV (Hexan) λ max: 331, 317, 298, 293, 288, 237, 223 nm

MS: m/z 214 (M^+; 60 %), 200 (18), 199 (100), 185 (6), 184 (30), 183 (7), 171 (6), 170 (6), 169 (10), 165 (6), 155 (7), 141 (5), 128 (7), 115 (5), 93 (9), 92 (11), 91 (10), 81 (7),

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm): s. Tab. 7, S. 41

7.11. 4-Methoxyisocadalin (Verbindung XXIII)

Die präparative HPLC der Fraktion O/2 in System 1 lieferte 45 mg einer öligen Substanz, die nach langem Stehenlassen im Tiefkühlschrank kristallisierte.

Farblose, plättchenförmige Kristalle; Smp.: 71 - 72° C

IR (KBr), cm^{-1}: 1620, 1605, 1570, 1508 (Aromat); 1385, 1350 (Isopropylgruppe); 2825, 1095 (Ether)

UV (Hexan) λ max: 292, (252), 236 nm

MS: m/z 228 (M^+; 100 %), 214 (14), 213 (91), 199 (4), 198 (18), 197 (7), 185 (23), 184 (31), 183 (9), 173 (8), 171 (8), 170 (9), 169 (8), 165 (11), 155 (15), 153 (10), 143 (5), 128

(8), 115 (8), 107 (8), 99 (10), 98 (7)

^{1}H-NMR (360 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm): s. Tab. 8, S. 46

7.12. Fraktionierung des Petroletherextraktes

2,5 kg getrocknete und gemahlene Blüten wurden in einer Normschliff-Extraktionsanlage nach dem Soxhlettverfahren mit 20 l

Tab. 17: Säulenchromatographische Auftrennung von 10 g Petroletherextrakt an Kieselgel 60

Fraktion	Elutionsmittel	Gewicht	Hauptkomponenten
A 1	Petrolether	0,275 g	nicht identifizierte Substanzen
A 2	Petrolether/ Ether (97/3)	1,011 g	Verbindung I
A 3	Petrolether/ Ether (9/1)	1,695 g	nicht identifizierte Substanzen
A 4	Petrolether/ Ether (9/1)	0,573 g	Verbindung XXI Verbindung XXII
A 5	Petrolether/ Ether (9/1)	0,125 g	nicht identifizierte Substanzen
A 6	Petrolether/ Ether (8/2)	0,298 g	nicht identifizierte Substanzen
A 7	Petrolether/ Ether (8/2)	0,222 g	Verbindung XXXVI Verbindung XXXVII Triterpene
A 8	Petrolether/ Ether (8/2)	0,545 g	nicht identifizierte Substanzen
A 9	Ether	0,449 g	Sterine
A 10	Methanol	4,480 g	nicht identifizierte Substanzen

Petrolether (40 - 60°) extrahiert. Rückstand: 97,6 g dickflüssiger, braunroter Petroletherextrakt. Die mit 25 g Blütendroge im Soxhlett ermittelte Extraktausbeute betrug 3,61 % des Blütentrockengewichtes.

10 g Petroletherextrakt wurden an 180 g Kieselgel 60 (70 - 230 mesh, MERCK) sc aufgetrennt. Als Elutionsmittel dienten Petrolether, Petrolether/Ether-Gemische, Ether und Methanol. Es wurden Fraktionen zu 100 ml aufgefangen, im DC-System 1 kontrolliert und zu 10 Fraktionen zusammengefaßt (s. Tab. 17, S. 115).

7.12.1. Cadalin (Verbindung I)

Die sc Auftrennung der Fraktion A 2 (1,001 g) an 120 g Kieselgel mit dem Elutionsgemisch Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80/15/5) lieferte 53 mg einer dc und gc reinen gelblichen, öligen Substanz, die mit dem aus dem ätherischen Öl isolierten Cadalin identisch war.

7.12.2. 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin und 7-Hydroxycadalin (Verbindung XXI und Verbindung XXII)

Aus Fraktion A 4 (573 mg) fielen beim Stehenlassen im Tiefkühlschrank farblose Kristalle aus. Sie wurden abfiltriert und im GC-System 3 überprüft. Es handelte sich um zwei Substanzen im Verhältnis von ca. 3 : 1. Sie wurden durch präparative HPLC in System 1 getrennt. Es handelte sich um 7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Verbindung XXI, 42 mg) und um 7-Hydroxycadalin (Verbindung XXII, 12,5 mg), die beide bereits aus dem ätherischen Öl isoliert wurden.

7.12.3. 4-Hydroxy-2-isopropyl-4,7-dimethyl-1(4H)-naphthalinon (Verbindung XXXVI)

Bei der Isolierung der Triterpene aus Fraktion A 7 (s. Kap. 7.12.5.) fiel eine Teilfraktion (67 mg) an, die praktisch nur aus einer Hauptkomponente bestand (GC-Analyse in System 3). Diese Hauptkomponente wurde durch präparative HPLC in System 1 isoliert. Danach lagen 35 mg einer farblosen öligen Substanz dc und gc rein vor, die bei längerem Stehenlassen im Tiefkühlschrank kristallisierte.

Farblose Kristalle; Smp.: 74 - 75° C

IR (KBr), cm^{-1}: 3465 (OH-Gruppe); 1655, 1635, 1605 (C=O, α,β-ungesättigt); 1385, 1368 (Isopropylgruppe); 1570, 1495 (Aromat)

UV (Hexan) λ max: 300, 272, 252, 245, 233, 213 nm

MS: m/z 230 (M^+; 60 %), 216 (39), 215 (100), 213 (20), 202 (21), 197 (67), 189 (16), 188 (99), 187 (98), 185 (12), 175 (10), 174 (18), 173 (58), 172 (23), 169 (35), 161 (38), 159 (30), 157 (20), 155 (13), 145 (18), 143 (12), 141 (21), 129 (20), 128 (32), 127 (11), 119 (28), 115 (27), 105 (8), 94 (18), 91 (22), 43 (27)

^{1}H-NMR (360 MHz, C_6D_6, TMS, ppm): s. Tab. 11, S. 60

7.12.4. 2,3-Epoxy-7-hydroxy-β-calacoren (Verbindung XXXVII)

Bei der Isolierung von Verbindung XXXVI durch präparative HPLC (s. Kap. 7.12.3.) fielen 4 mg einer kristallinen Substanz an, die jedoch instabil war und sich in Lösung unter Gelbfärbung zersetzte. Deshalb wurde diese Substanz gezielt nachisoliert.

20 g Petroletherextrakt wurden an 390 g Kieselgel 60 mit dem Elutionsmittel Petrolether/Ether (1/1) sc aufgetrennt. Die Teilfraktion mit der gesuchten Substanz (2,678 g; GC-System 3) wurde durch Niederdruck-Chromatographie an einer Altexsäule mit Hexan/Isopropanol (99/1) weiter gereinigt. Ergebnis: 930 mg einer Fraktion mit der gesuchten Verbindung. Aus dieser Fraktion wurden durch präparative HPLC (System 1) 55 mg der Substanz fast rein gewonnen. Nach Elution über eine Lobar-Säule (Gr. B; Kieselgel 60) mit Dichlormethan lagen 30 mg leicht gelblicher Kristalle gc und dc rein vor.

Smp.: 139 - 142° C

IR (KBr), cm^{-1}: 3400 (OH-Gruppe); 1615, 1585, 1510 (Aromat); 3095, 895 (Exomethylengruppe); 1390, 1370 (Isopropylgruppe)

UV (Hexan) λ max: 302, 253, 217 nm

MS: m/z 230 (M^+; 42 %), 188 (23), 187 (100), 171 (15), 160 (8), 159 (9), 157 (7), 145 (9), 144 (41), 141 (24), 131 (18), 128 (14), 116 (11), 115 (23), 103 (5), 91 (16), 77 (9), 63 (9), 51 (11), 43 (13), 41 (11)

^{1}H-NMR (360 MHz, $CDCl_3$, TMS, ppm): s. Tab. 12, S. 67

7.12.5. Triterpene

Fraktion A 7 (222 mg) wurde mit Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80+15/5) an 120 g Kieselgel sc aufgetrennt. Es wurden fünf Fraktionen gewonnen (12 mg, 73 mg, 18 mg, 67 mg und 45 mg). Die Teilfraktion mit den Triterpenen (73 mg) wurde acetyliert und anschließend mit dem gleichen Elutionsmittel an einer Kieselgelsäule gereinigt. Danach lagen 43 mg dc ein-

heitliche Triterpenacetate vor (Smp. 175 - 178° C).
10 mg der Triterpenacetate wurden an mit $AgNO_3$ imprägnierten Kieselgelplatten im DC-System 2 präparativ aufgetrennt, wobei ca. 3 mg pro Platte aufgetragen wurden. Es wurden zwei Fraktionen erhalten: Fraktion I: 6,5 mg; Fraktion II: 2,5 mg
Weiterhin wurden 20 mg der Triterpenacetate an einer mit $AgNO_3$ (ca. 20 %) imprägnierten Kieselgelsäule mit dem Elutionsmittel Hexan/Benzol (1/1) in fünf Fraktionen aufgetrennt: 10 mg, 4 mg, 2 mg, 1,5 mg und 0,5 mg. Diese Fraktionen wurden zur GC und GC/MS-Analyse verwendet.

7.12.6. Sterine

Fraktion A 9 (449 mg) wurde an 120 g Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80/15/5) sc aufgetrennt und die Fraktion mit den Sterinen (154 mg) erneut mit dem gleichen Elutionsmittel sc aufgetrennt. Es wurden fünf Fraktionen erhalten, wobei in einer (4 mg) Δ5-Sterine nicht dc rein und in einer zweiten (104 mg) Δ7-Sterine dc rein vorlagen. Nach Umkristallisation aus Aceton besaßen diese einen Schmelzbereich von 158 - 161° C.

7.13. Arnica montana

7.13.1. Herkunft

Die zu Vergleichszwecken herangezogenen Blüten von Arnica montana L. wurden von der Firma Caelo, Hilden/Rhld., als „Flores Arnicae DAB 8" bezogen. Die Droge war spanischer Herkunft.

7.13.2. Ätherisches Öl

Aus 10 g Droge wurde das ätherische Öl wie in Kap. 7.7. beschrieben abgetrennt. Ergebnis: 27 mg

Das ätherische Öl wurde an einer Kieselgelsäule in Kohlenwasserstoffe und sauerstoffhaltige Verbindungen getrennt (s. Kap. 7.8.). Die Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion wurde zur GC- und GC/MS-Untersuchung verwendet.

7.13.3. Petroletherextrakt

10 g gepulverte Droge wurden im Soxhlett mit Petrolether (40 - 60°) extrahiert. Ergebnis: 0,332 g Petroletherextrakt

200 mg Petroletherextrakt wurden durch Niederdruck-Chromatographie an einer Lobar-Säule (Größe A) mit dem Elutionsmittel Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80/15/5) fraktioniert und die Teilfraktion, die Caryophyllenoxid enthielt (DC-Analyse in System 1), zur GC- und GC/MS-Untersuchung verwendet.

8. Anhang Massenspektren

(Abszisse: m/z; Ordinate: % relative Intensität)

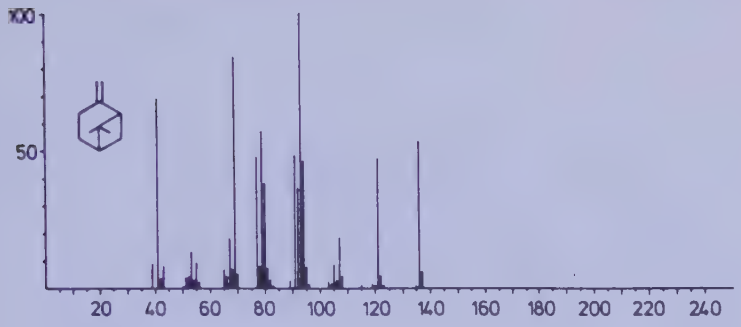


Abb. 48: Massenspektrum von β-Pinen (II)

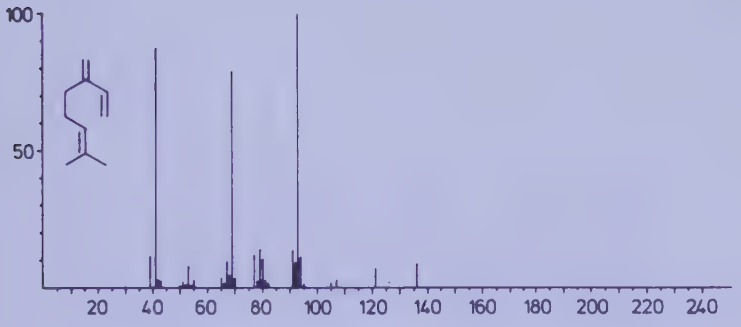


Abb. 49: Massenspektrum von Myrcen (III)

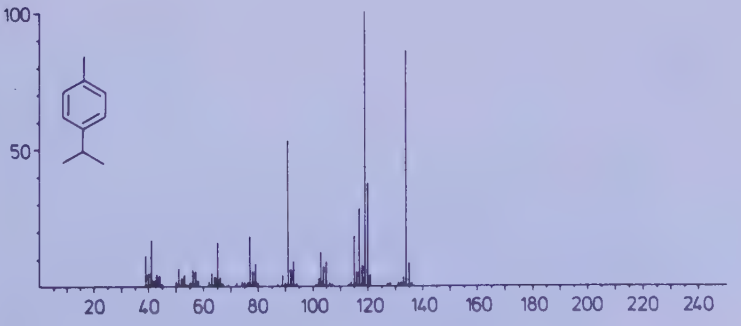


Abb. 50: Massenspektrum von p-Cymen (IV)

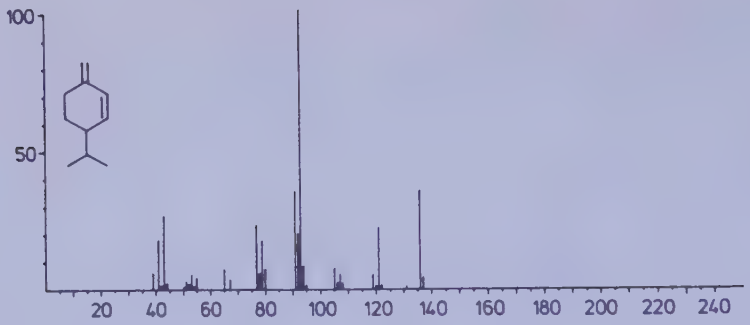


Abb. 51: Massenspektrum von β-Phellandren (V)

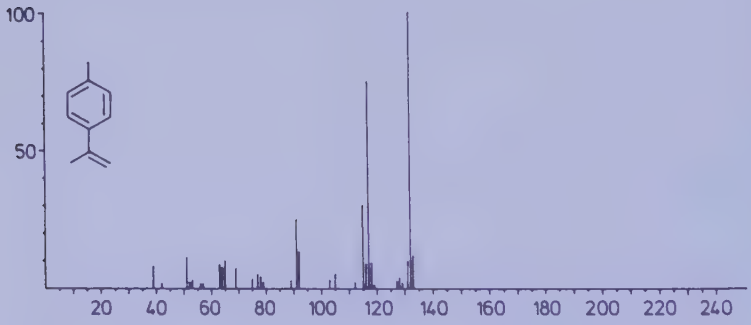


Abb. 52: Massenspektrum von α,p-Dimethylstyren (VI)

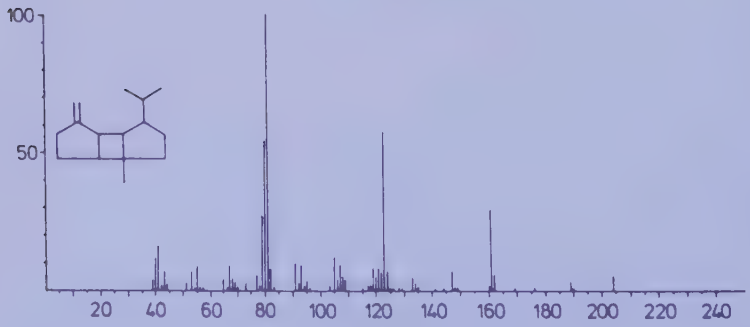


Abb. 53: Massenspektrum von β-Bourbonen (VII)

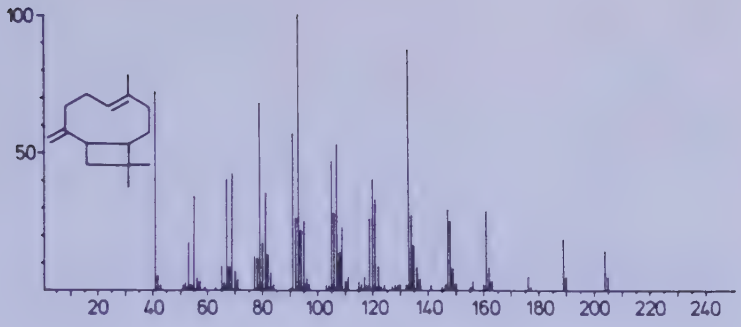


Abb. 54: Massenspektrum von β-Caryophyllen (VIII)

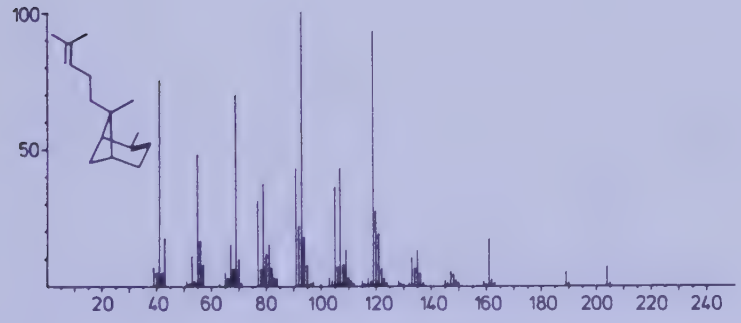


Abb. 55: Massenspektrum von α-trans-Bergamoten (IX)

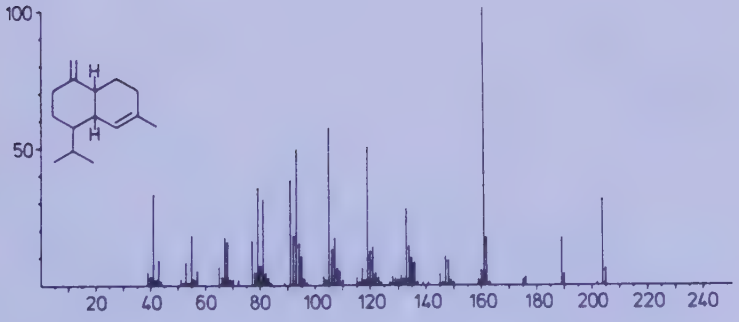


Abb. 56: Massenspektrum von γ-Muurolen (X)

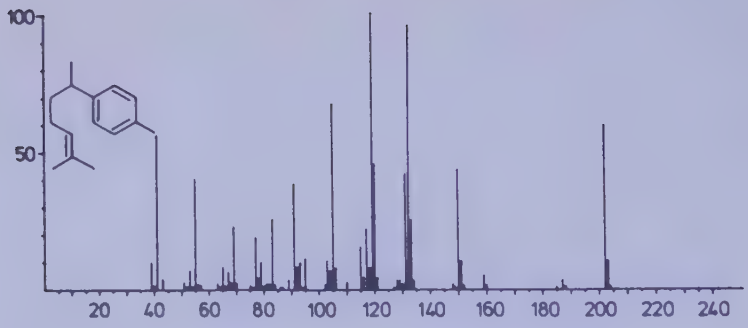


Abb. 57: Massenspektrum von α-Curcumen (XI)

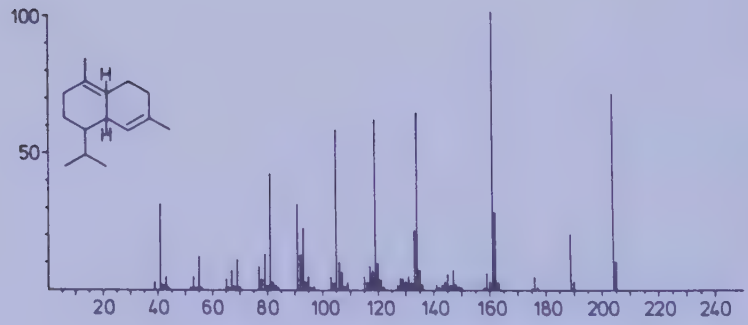


Abb. 58: Massenspektrum von δ-Cadinen (XII)

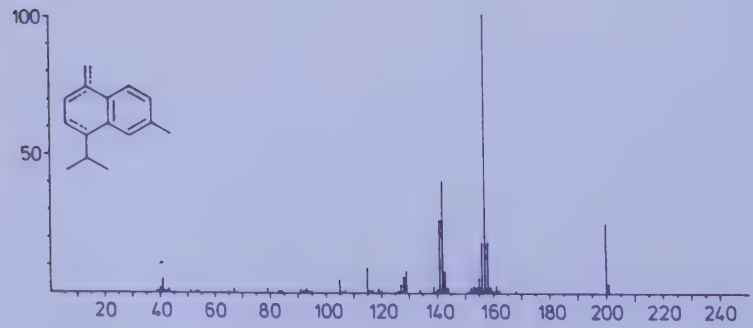


Abb. 59: Massenspektrum von Calacoren (XIII)

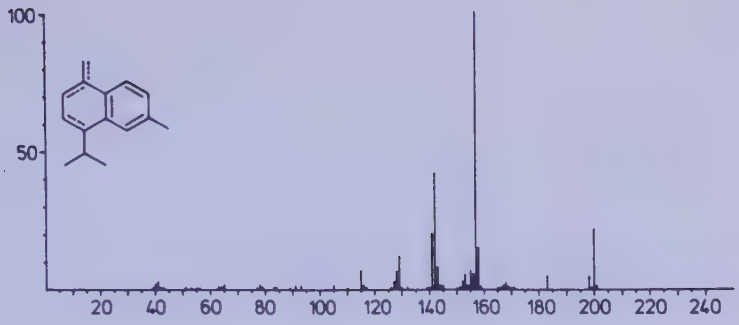


Abb. 60: Massenspektrum von Calacoren (XIV)

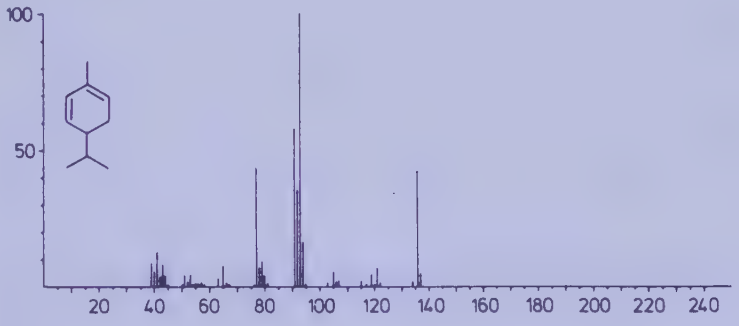


Abb. 61: Massenspektrum von α-Phellandren (XV)

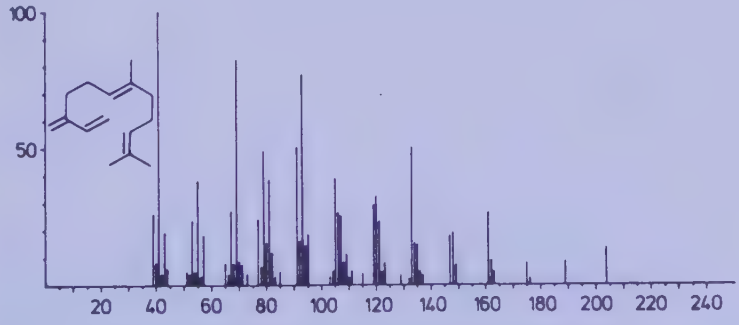


Abb. 62: Massenspektrum von β-trans-Farnesen (XVII)

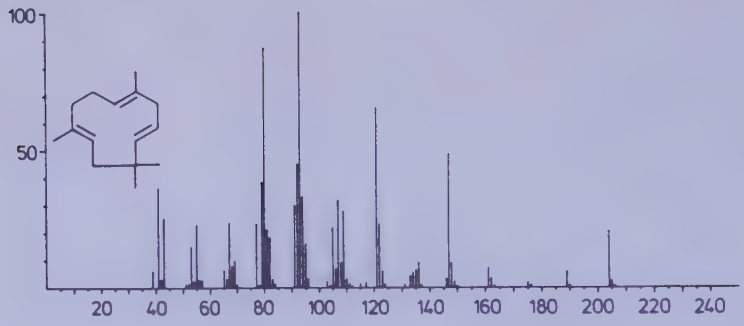


Abb. 63: Massenspektrum von α-Humulen (XVIII)

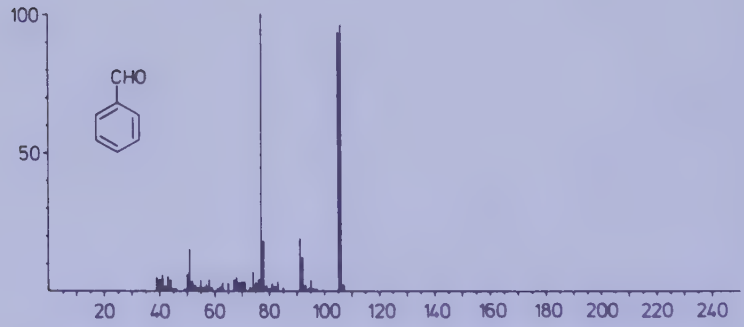


Abb. 64: Massenspektrum von Benzaldehyd (XXIV)

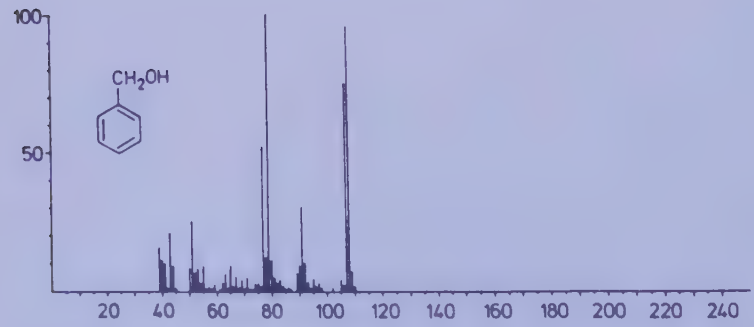


Abb. 65: Massenspektrum von Benzylalkohol (XXV)

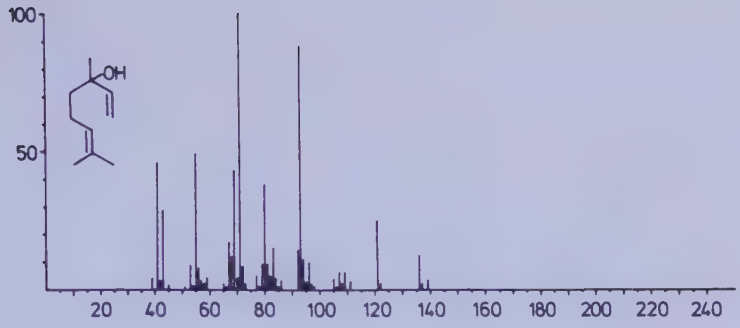


Abb. 66: Massenspektrum von Linalool (XXVI)

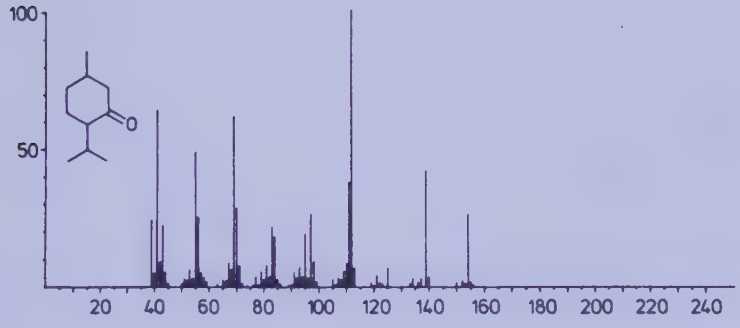


Abb. 67: Massenspektrum von Menthon (XXVII)

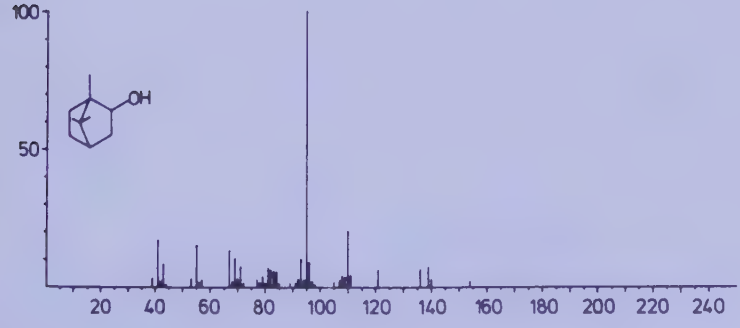


Abb. 68: Massenspektrum von Borneol (XXVIII)

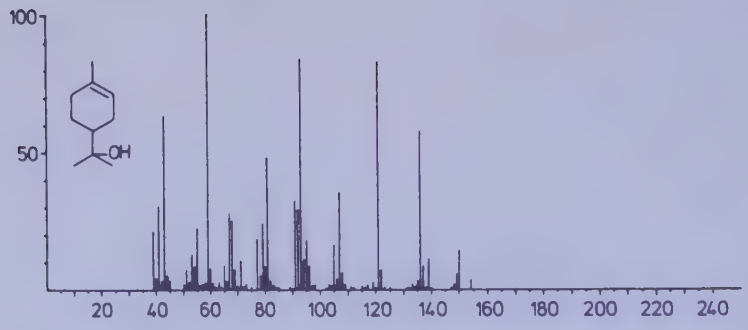


Abb. 69: Massenspektrum von α-Terpineol (XXIX)

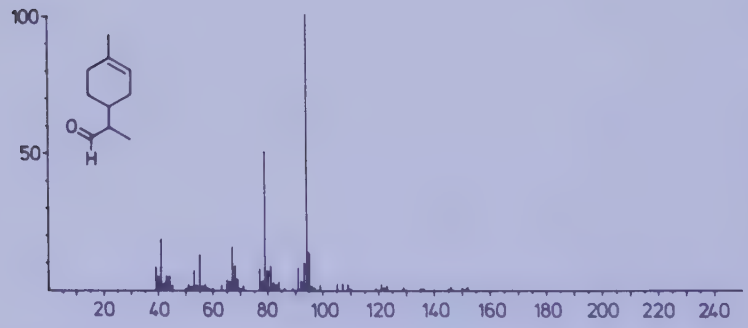


Abb. 70: Massenspektrum von 1-p-Menthen-9-al (XXX)

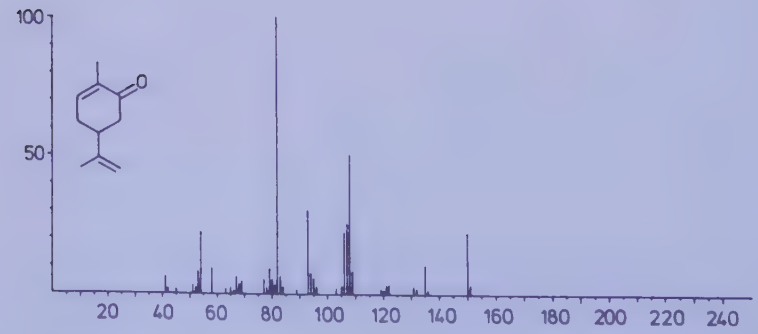


Abb. 71: Massenspektrum von Carvon (XXXI)

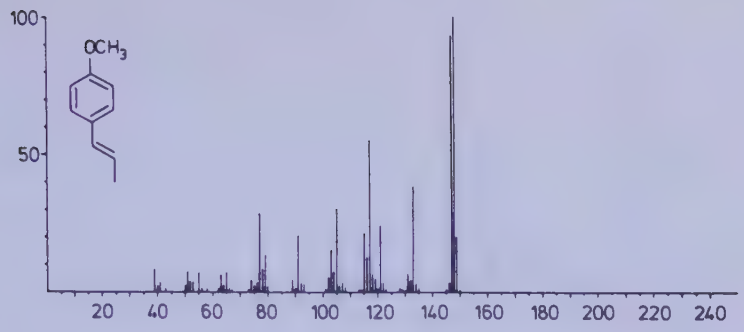


Abb. 72: Massenspektrum von trans-Anethol (XXXII)

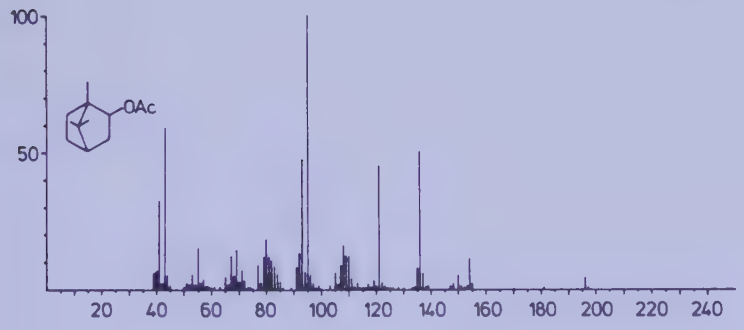


Abb. 73: Massenspektrum von Bornylacetat (XXXIII)

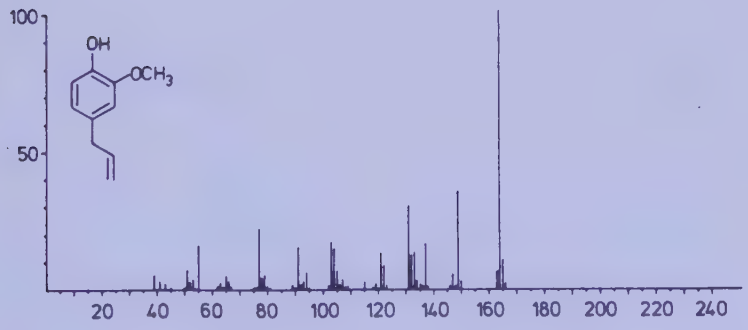


Abb. 74: Massenspektrum von Eugenol (XXXIV)

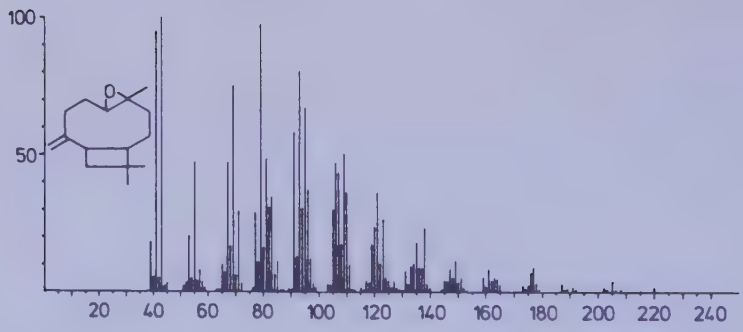


Abb. 75: Massenspektrum von Caryophyllenoxid (XXXV)

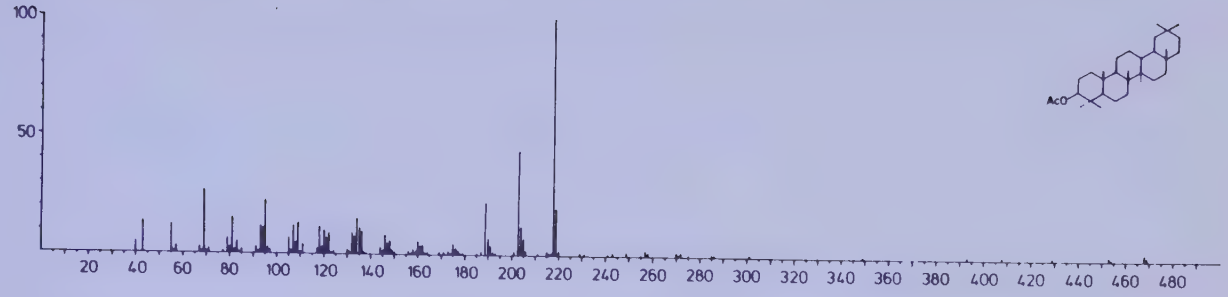


Abb. 76: Massenspektrum von β-Amyrinacetat (XXXVIII)

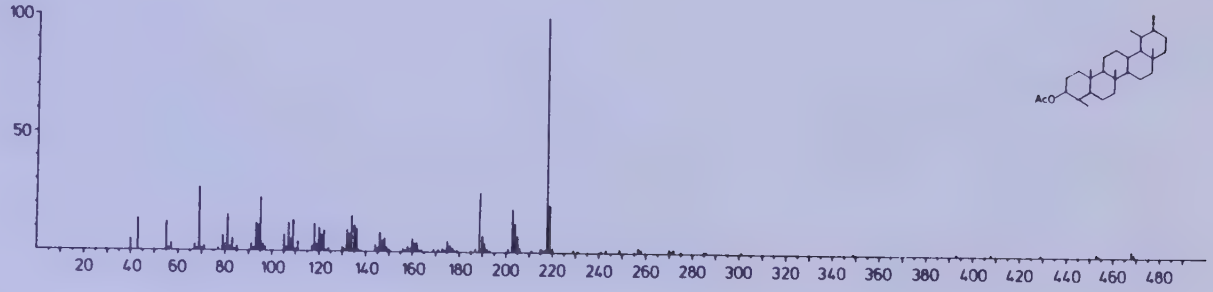


Abb. 77: Massenspektrum von α-Amyrinacetat (IXL)

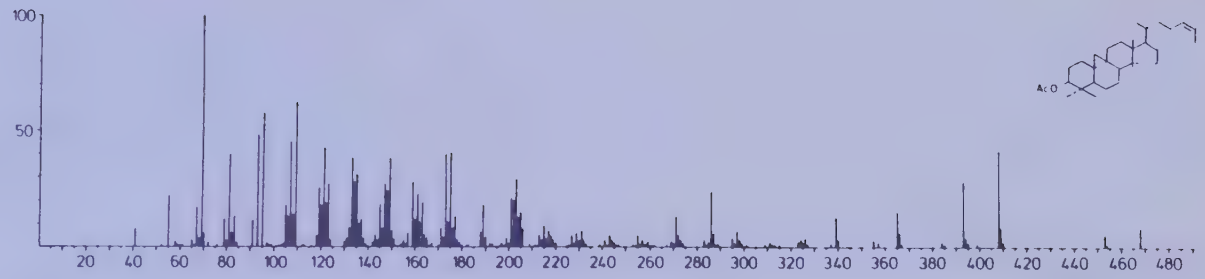


Abb. 78: Massenspektrum von Cycloartenolacetat (XL)

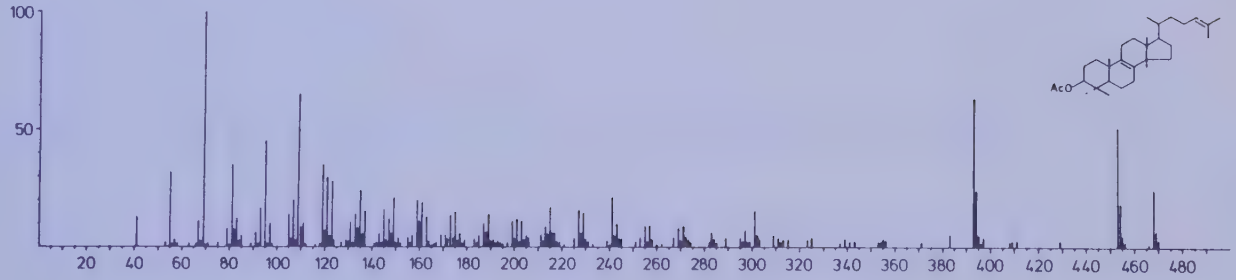


Abb. 79: Massenspektrum von Lanosterolacetat (XLI)

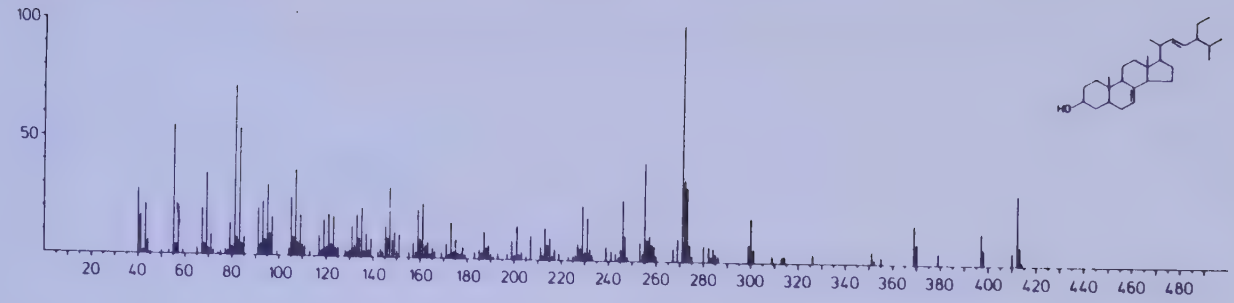


Abb. 80: Massenspektrum von α-Spinasterol (XLIII)

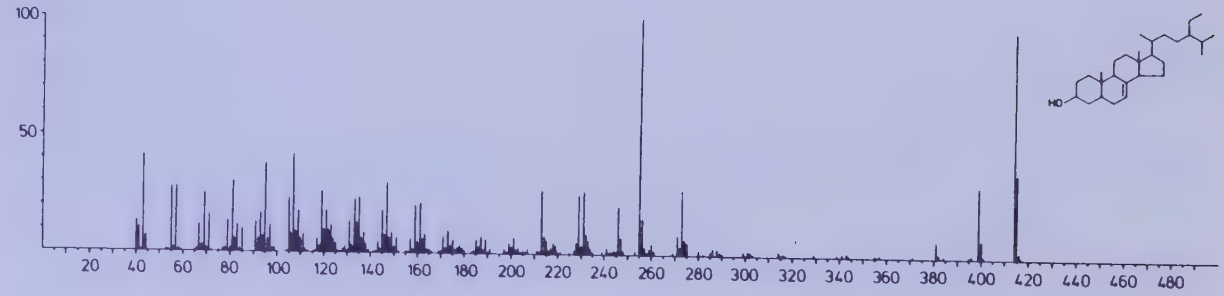


Abb. 81: Massenspektrum von Δ7-Stigmastenol (XLIV)

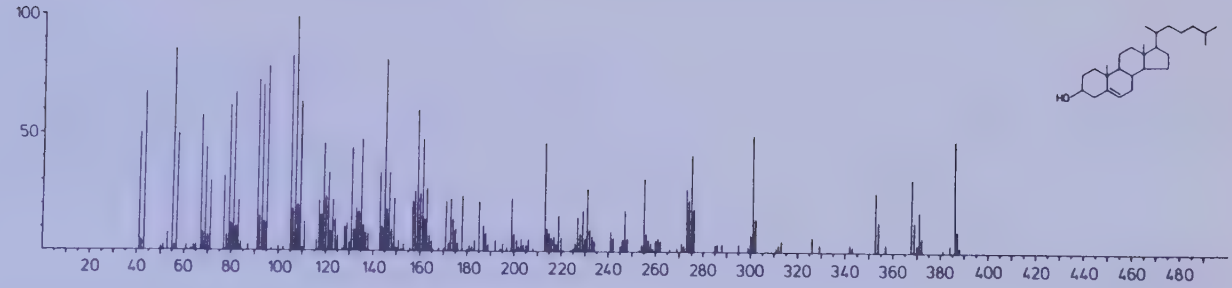


Abb. 82: Massenspektrum von Cholesterol (XLVI)

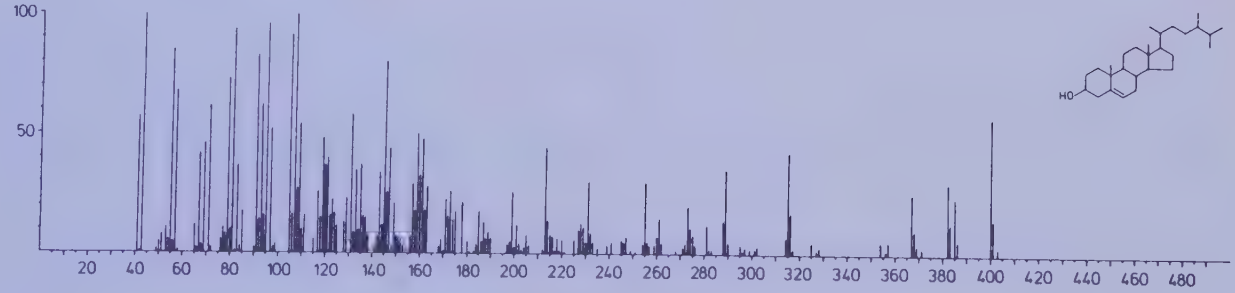


Abb. 83: Massenspektrum von Campesterol (XLVII)

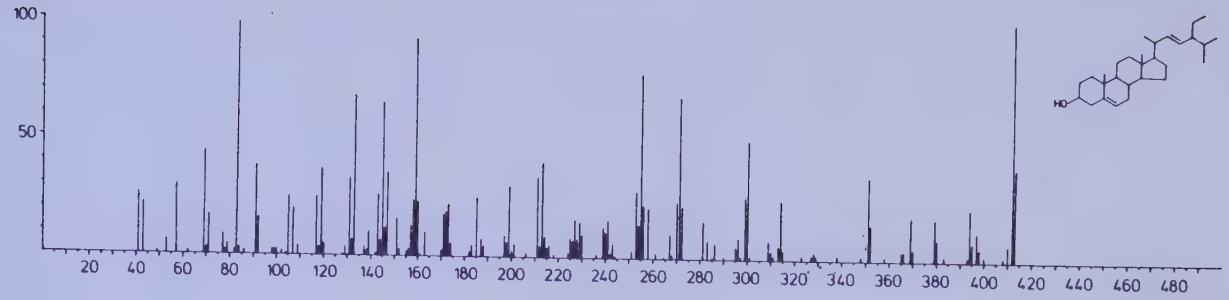


Abb. 84: Massenspektrum von Stigmasterol (XLVIII)

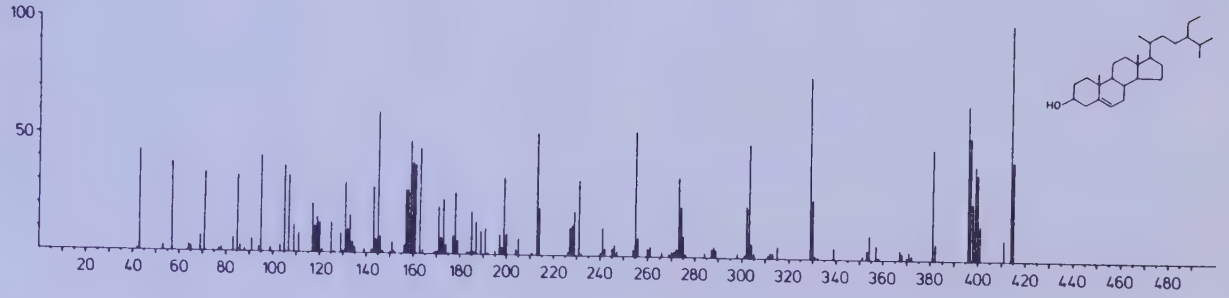


Abb. 85: Massenspektrum von β-Sitosterol (IL)

9. Literaturverzeichnis

1. SCHILCHER, H.:
   Qualitätsprüfung von Handelsdrogen. Dtsch. Apoth. Ztg. 105, 1067-1072 (1965)

2. BECKER, H.:
   Aktuelle Drogenverfälschungen. Pharm. Ztg. 116, 277 (1971)

3. FROHNE, D.:
   Anatomisch-mikrochemische Drogenanalyse, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974

4. WILLUHN, G. u. RÖTTGER, P.-M.:
   Heterotheca inuloides Cass., die „Mexikanische Arnica". Dtsch. Apoth. Ztg. 120, 1039-1042 (1980)

5. DIAS, J. L.:
   Indice y sinonimia de las plantas medicinales de Mexico: Monografias Cientificas I, Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, Mexico 1976

6. DIAS, J.L.:
   Usos de las plantas medicinales de Mexico: Monografias Cientificas II, Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, Mexico 1976

7. MARTINES, M.:
   Las plantas medicinales de Mexico, 5. Auflage, Editorial Botas, Mexico 1969

8. CABRERA, L. G.:
   Plantas curativas de Mexico, Ed. Ciceron, Mexico 1943

9. NUEVA FARMACOPEA MEXICANA,
   Ed. Botas, Mexico 1952

10. URBINA, M.:
    Catalogo de plantas mexicanas (fanerogamas), Imprenta del Museo Nacional Mexico 1897

11. SUC, L.:
    Les Plantes Medicinales du Mexique, Diss. Nr. XV, Université de Toulouse, Faculté mixte de Medicine et de Pharmacie 1912

12. BRUCIAGA, A.:
Estudios comparativos sobre las flores dos arnica del pais y extranjera. Tesis, Mexico 1896

13. BOHLMANN, F. u. ZDERO, CH.:
Ober die Inhaltsstoffe von Heterotheca inuloides Cass. Chem. Ber. 109, 2021-2025 (1976)

14. SCHEFFER, J. J. C.:
Analysis of essential oils by combined liquid-solid and gas-liquid chromatography, Dissertation, Leiden 1978

15. KUBECZKA, K.-H.:
Vortrennung ätherischer Öle und ähnlich komplexer Stoffgemische für die GC-Analyse durch modifizierte Trockensäulen-Chromatographie, Chromatographia 6, 106-108 (1973)

16. SCHWANBECK, J. u. KUBECZKA, K.-H.:
Einsatzmöglichkeiten der HPLC bei der Trennung von flüchtigen Terpenkohlenwasserstoffen, in Kubeczka, K.-H. (Hrsg.): Vorkommen und Analytik ätherischer Öle, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979

17. NORIN, T. u. WESTFELT, L.:
Thin layer, column, and gas liquid chromatography of resin acid esters and related terpenes. Acta Chem. Scand. 17, 1828-1829 (1963)

18. VONACH, B. u. SCHOMBURG, G.:
High-performance liquid chromatography with Ag^+ complexation in the mobile phase. J. Chromatogr. 149, 417-430 (1978)

19. PLIVA, J., HEROUT, V., SCHNEIDER, B. u. SORM, F.:
On terpenes: XLIII. Infrared investigations of terpenes IV. Collect. Czech. Chem. Comm. 18, 500-510 (1953)

20. NAGASAMPAGI, B. A., SUKH DEV, RAI, C. u. MURTHY, K. L.:
Studies in sesquiterpenes-XXIII: Methylcadalenes-synthesis and characterisation. Tetrahedron 22, 1949-1976 (1966)

21. JENNINGS, W. u. SHIBAMOTO, T.:
Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles

by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York 1980

22. ANDERSEN, N. H. u. SYRDAL, D. D.:
Terpenes and Sesquiterpenes of Chamaecyparis nootkatensis leaf oil. Phytochemistry 9, 1325-1340 (1970)

23. JUVONEN, S.:
Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung von Kiefernnadelöl (Pinus silvestris L.). Farm. Aik. 79, 137-145 (1970)

24. KRISHNAPPA, S. u. SUKH DEV:
Sesquiterpenes from Lansium anamalayanum. Phytochemistry 12, 823-825 (1973)

25. KUBECZKA, K.-H. u. STAHL, E.:
Ober ätherische Öle der Apiaceae (Umbelliferae). Planta Med. 27, 235-241 (1975)

26. RUSELL, G. F. u. JENNINGS, W. G.:
Constituents of Black Pepper: Some oxygenated Compounds. J. Agr. Food Chem. 17, 1107-1112 (1969)

27. MACLEOD, A. J. u. PIERIS, N. M.:
Analysis of the volatile essential oils of Murraya koenigii and Pandanus latifolius. Phytochemistry 21, 1653-1657 (1982)

28. MURRAY, K. E.:
α-Farnesene: Isolation from the natural coating of apples. Aust. J. Chem. 22, 197-204 (1969)

29. RUSELL, G. F., MURRAY, W. J., MULLER, C. J. u. JENNINGS, W. G.:
α-Bergamotenes in oil of Black Pepper. J. Agr. Food Chem. 16, 1047-1049 (1968)

30. SAKAI, T., NISHIMURA, K. u. HIROSE, Y.:
The structure and stereochemistry of four new sesquiterpenes isolated from the wood oil of "Kaya" (Torreya nucifera). Bull. Chem. Soc. Japan 38, 381-387 (1965)

31. BUTTERY, R. G., SEIFERT, R. M., GUADAGNI, D. G., BLACK, D. R. u. LING, L. C.:

Characterisation of some volatile constituents of Carrots. J. Agr. Food Chem. 16, 1009-1015 (1968)

32. RYHAGE, R. u. VON SYDOW, E.:
Mass spectrometry of terpenes I: Monoterpene Hydrocarbons Acta. Chem. Scand. 17, 2025-2035 (1963)

33. THOMAS, A. F. u. WILLHALM, B.:
Les spectres de masse des hydrocarbures monoterpéniques. Helv. Chim. Acta 47, 475-487 (1964)

34. MOSHONAS, M. G. u. LUND, E. D.:
The mass spectra of Sesquiterpene Hydrocarbons. Flavour Ind. 1, 375-378 (1970)

35. GONZLER, H. u. BÖCK, H.:
IR-Spektroskopie. Eine Einführung. Verlag Chemie, Weinheim 1983

36. GALLAGHER, M. J. u. SUTHERLAND, M. D.:
2-Hydroxy- and 7-Hydroxy-cadalene. Aust. J. Chem. 18, 1111-1113 (1965)

37. FRACHEBOUD, M., ROWE, J. W., SCOTT, R. W., FANEGA, A. J., BUHL, A. J. u. TODA, J. K.:
New Sesquiterpenes from Yellow Wood of Slippery Elm. For. Prod. J. 18, 37-40 (1968)

38. ALEXANDER, J. u. KRISHNA RAO, G. S.:
Sysnthesis of 7-Hydroxycadalenal and some related naturally occuring Sesquiterpenoids. Tetrahedron 27, 645-651 (1971)

39. HAYASHI, Y. u. TAKAHASHI, T.:
Zelkoserratone and Homozelkoserratone, New Cadalenic Sesquiterpenes from the Heartwood of Zelkova serrata. Mokuzai Gakkaishi 26, 54-55 (1980)

40. SANKARAM, A. V. B., REDDY, N. S. u. SHOOLERY, J. N.:
New Sesquiterpenoids from Bombax malabaricum. Phytochemistry 20, 1877-1881 (1981)

41. ADACHI, K. u. TANIGUCHI, N.:
Studies of Aromatic Sesquiterpenes. III. The Synthesis of 4-Methoxyisocadalene. Bull. Chem. Soc. Jpn. 55, 1655-1656 (1982)

42. STENHAGEN, E., ABRAHAMSSON, S. u. MCLAFFERTY, F. W.:
Registry of Mass Spectral Data Vol. I. J. Wiley and Sons, New York 1974

43. GONTHER, H.:
NMR-Spektroskopie. Eine Einführung in die Protonenresonanz-Spektroskopie und ihre Anwendungen in der Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1983

44. PRETSCH, CLERC, SEIBL u. SIMON:
Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1981

45. VON SYDOW, E.:
Mass Spectrometry of Terpenes. II. Monoterpene Alcohols. Acta Chem. Scand. 17, 2504-2512 (1963)

46. VON SYDOW, E.:
Mass Spectrometry of Terpenes. III. Monoterpene Aldehydes and Ketones. Acta Chem. Scand. 18, 1099-1104 (1964)

47. VON SYDOW, E.:
Mass Spectrometry of Terpenes. IV. Esters of Monoterpene Alcohols. Acta Chem. Scand. 19, 2083-2088 (1965)

48. WILLHALM, B., THOMAS, A. F. u. STOLL, M.:
Mass Spectra and Organic Analysis IV. Some Comments on the Mass Spectra of Monoterpene Alcohols. Acta Chem. Scand. 18, 1573-1576 (1964)

49. WILLHALM, B. u. THOMAS, A. F.:
Mass Spectra and Organic Analysis VI. The Mass Spectra of Menthone, Isomenthone and Carvomenthone. J. Chem. Soc. 6478-6485 (1965)

50. HURABIELLE, M., BASTART-MALSOT, M., ROUGEOT, E. u. PARIS, M.:
Contribution à L'Etude Chimique de L'Huile Essentielle D'Artemisia arborescens. Planta Med. 44, 47-49 (1982)

51. SPITELLER, G.:
Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen. Eine Einführung. Verlag Chemie, Weinheim 1966

52. WALLER, G. R.:
Biochemical applications of mass spectrometry. Wiley, New York 1972

53. BUDZIKIEWICZ, H.:
Massenspektrometrie. Eine Einführung. Verlag Chemie, Weinheim 1980

54. WILLIAMS, D. H. u. FLEMING, I.:
Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975

55. BOHLMANN, F., ZDERO, C., ROBINSON, H. u. KING, R. M.:
Neue Cadinen- und Norcadinen-Derivate aus Heterotheca grandiflora. Phytochemistry 18, 1675-1680 (1979)

56. WILLUHN, G. u. KÜSTENS, J.:
Solanum dulcamara L.: Triterpenoide und Sterine aus dem Petroletherextrakt der Blätter. Planta Med. 25, 115-132 (1974)

57. WILLUHN, G. u. RICHTER, W.:
Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Sambucus nigra. II. Die lipophilen Bestandteile der Blüten. Planta Med. 31, 328-343 (1977)

58. ITOH, T., TANI, H., FUKUSHIMA, K., TAMURA, T. u. MATSUMOTO, T.:
Structure-retention relationship of sterols and triterpene alcohols in gas chromatography on a glass capillary column. J. Chromatogr. 234, 65-76 (1982)

59. IKAN, R.:
Thin-layer chromatography of tetracyclic triterpenes on silica impregnated with silver nitrate. J. Chromatogr. 17, 591-593 (1965)

60. FISCHER, F. u. HERTEL, R.:
Dünnschichtchromatographie isomerer Triterpene an Anasil B und Kieselgel/$AgNO_3$. J. Chromatogr. 38, 274-281 (1968)

61. BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M. u. DJERASSI, C.:
Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. J. Am. Chem. Soc. 85, 3688-3699 (1963)

62. ITOH, T., TAMURA, T. u. MATSUMOTO, T.:
Triterpene alcohols in the seed of Solanaceae. Phytochemistry 16, 1723-1726 (1977)

63. NIELSEN, P. E., NISHIMURA, H., LIANG, Y. u. CALVIN, M.:
Steroids from Euphorbia and other latex-bearing plants. Phytochemistry 18, 103-104 (1979)

64. APLIN, R. T. u. HORNBY, G. M.:
Application of mass spectrometry to the structural investigation of 9,19-cyclosterols and triterpenes. J. Chem. Soc. B 1078-1079 (1966)

65. AUDIER, H. E., BEUGELMANS, R. u. DAS, B. C.:
Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes. II. The lanostane group: influence of the 9:19-cyclopropane ring. Tetrahedron Lett. 36, 4341-4347 (1966)

66. GOULSTON, G., MERCER, E. I. u. GOAD, L. J.:
The identification of 24-methylene-24,25-dihydrolanosterol and other possible precursors in Phycomyces blakesleeanus and Agaricus campestris. Phytochemistry 14, 457-462 (1975)

67. KNIGHTS, B. A.:
Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. J. Gas Chromatogr. 5, 273-282 (1967)

68. WYLLIE, S. G. u. DJERASSI, C.:
Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLVI. Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side cains. J. Org. Chem. 33, 305-313 (1968)

69. ITOH, T., TAMURA, T. u. MATSUMOTO, T.:
Sterols, Methylsterols, and Triterpene Alcohols in three Theaceae and some other Vegetable Oils. Lipids 9, 173-184 (1974)

70. CLARK-LEWIS, J. W. u. DAINIS, I.:
The phytosterols from Acacia species: α-Spinasterol and Stigmast-7-enol. Aust. J. Chem. 20, 1961-1974 (1967)

71. WAN, A. S., AEXEL, R. T., RAMSEY, R. B. u. NICHOLAS, H. J.:
Sterols and triterpenes of the Pitcher plant. Phyto-

chemistry 11, 456-461 (1972)

72. KNAPP, F. F. u. NICHOLAS, H. J.:
The sterols and triterpenes of Banana peel. Phytochemistry 8, 207-214 (1969)

73. LENFANT,M., LECOMPTE, M. F. u. FARRUGIA, G.:
Identification des stérols de Physarum polycephalum. Phytochemistry 9, 2529-2535 (1970)

74. BOHLMANN, F., ZDERO, C. u. KAPTEYN, H.:
Über die Acetylenverbindungen des Tribus Astereae. Chem. Ber. 102, 1682-1690 (1969)

75. SAUKEL, J.:
Pharmakobotanische Untersuchungen von Arzneidrogen III. Unterscheidungsmerkmale der Blütendrogen von Arnica montana L. und Heterotheca inuloides Cass. Sci. Pharm. 52, 35-46 (1984)

76. BOHLMANN, F. u. ZDERO, C.:
Neue Cadinan-Derivate aus Heterotheca subaxillaris. Phytochemistry 18, 1185-1187 (1979)

77. BOHLMANN, F., GUPTA, R. K., KING, R. M. u. ROBINSON, H.:
New cadinene derivatives from Heterotheca latifolia. Phytochemistry 21, 2982-2984 (1981)

78. STAHL, E.:
Dünnschichtchromatographie; Ein Laboratoriumshandbuch. 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1967

79. FIORITTI, F. A. u. SIMS, R. J.:
A spray reagent for the identification of epoxides on thin layer plates. J. Chromatogr. 32, 761-763 (1968)

80. GONTZEL, U., SEIDEL, F. u. KATING, H.:
Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten I. Der Gehalt an ätherischem Öl in den Blüten verschiedener Arnica-Arten. Planta Med. 15, 205-214 (1967)

81. WILLUHN, G.:
Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten II. Der Gehalt an ätherischem Öl in Wurzeln und Rhizomen verschiedener Arnica-Arten. Planta Med. 17, 127-138 (1969)

82. WILLUHN, G.:
Neue Ergebnisse der Arnikaforschung. Pharm. Unserer Zeit 10, 1-7 (1981)

83. WILLUHN, G., RÖTTGER, P.-M. u. MATTHIESEN, U.:
Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester aus Blüten von Arnica montana. Planta Med. 49, 226-231 (1983)

84. WILLUHN, G.:
Arnica montana L. Monographie für die Kommission E des BGA, 1983

85. WILLUHN, G.:
Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten.V. Gehalt und Gehaltsschwankungen an ätherischem Öl in den verschiedenen Organen von Arnica-Arten. Planta Med. 21, 221-245 (1972)

86. FLOCK, H.:
Permeabilität und Sorption von Plastikbehältern. Dtsch. Apoth. Ztg. 107, 69-78 (1967)

87. BLAŽEK, Z. u. STERÝ, F.:
Einfluß der Aufbewahrung auf die Qualität der Kamillenblüten. Pharm. Zentralhalle 100, 366-371 (1961)

88. KATING, H., RINN, W. u. WILLUHN, G.:
Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten.III. Die Fettsäuren in den ätherischen Ölen der Blüten verschiedener Arnica-Arten. Planta Med. 18, 130-146 (1970)

89. WILLUHN, G.:
Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VII. Die Zusammensetzung des ätherischen Öles aus den unterirdischen Organen und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten. Planta Med. 22, 1-33 (1972)

90. GÓRA, J., KALEMBA, D., KUROWSKA, A. u. SWIATEK, L.:
Chemical substances from inflorescences of Arnica montana L. and Calendula officinalis L. soluble in isopropyl myristate and propylene glycol. Herb. Hung. 19, 165-171 (1980), s. auch Acta Horticulturae 96, (1980)

91. SCHULTE, K. E. u. RÖCKER, G.:
Polyacetylene und einige andere Inhaltsstoffe der Arnica-Blüten. Arch. Pharm. 299, 468-480 (1966)

92. LUCKNER, M.:
Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1969

93. SÁNCHEZ, E. L. u. BURKART, A. L.:
Chemical study of Senecio species. Triterpenes from Senecio burchelli D.C. Rev. Latinamer. Quim. 7, 123-125 (1976)

94. WILLUHN, G.:
Einige Aspekte der Biosynthese und des Stoffwechsels von Steroiden in Pflanzen. Pharm. Ztg. 121, 1491-1501 (1976)

95. ITOH, T., UETSUKI, T., TAMURA, T. u. MATSUMOTO, T.:
Characterisation of Triterpene Alcohols of Seed Oils from some Species of Theaceae, Phytolaccaceae and Sapotaceae. Lipids 15, 407-411 (1980)

96. WILLUHN, G., MAY, S. u. MERFORT, I.:
Triterpene und Steroide im Samen von Solanum dulcamara. Planta Med. 46, 99-104 (1982)

97. WILLUHN, G., MERFORT, I. u. MATTHIESEN, U.:
The occurence of Lanosterol and 24-Methylenelanost-8-en-3-β-ol in leaves of Symphoricarpus albus. Phytochemistry 22, 137-141 (1983)

98. KASPRZYK, Z. u. PYREK, J.:
Sterols of five plants of the Compositae family. Rocz. Chem. 41, 201-208 (1967) C. A. 67, 784 s (1967)

99. WILLUHN, G., KRESKEN, J. u. MERFORT, I.:
Arnikablüten: Identitäts- und Reinheitsprüfung. Dünnschichtchromatographie der Sesquiterpenlactone und Flavonoide. Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 2431-2434 (1983)

100. PONSINET, G. u. OURISSON, G.:
Aspects particuliers de la Biosynthèse des Triterpènes dans le Latex d'Euphorbia. Phytochemistry 7, 757-764 (1968)

LEBENSLAUF

Name	Richard Wilhelm Schneider
Geburtsdatum	18. Dezember 1953
Geburtsort	Schweinfurt
Eltern	Ludwig Schneider Anni Schneider, geb. Neubauer
Familienstand	verheiratet seit dem 01. 08. 1980 mit Ursel Schneider, geb. Himmelberg
Schulbildung	1960 - 1964 Volksschule in Untereuerheim 1964 - 1973 Alexander von Humboldt Gymnasium in Schweinfurt (Abitur)
Wehrdienst	07. 73 - 06. 75 Leutnant der Reserve
Hochschulstudium	11. 75 - 04. 79 Pharmaziestudium an der Julius Maximilian Universität in Würzburg 09. 77 erstes Staatsexamen 05. 79 zweites Staatsexamen
Pharmazeutisches Praktikum	05. 79 - 05. 80 Hochfeld-Apotheke in Schweinfurt
Pharmazeutische Prüfung	10. 07. 1980 in München
Approbation	22. 07. 1980
Promotion	Beginn der vorliegenden Arbeit am 01. 09. 1980 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn
Assistenten-tätigkeit	01. 09. 80 - 31. 03. 81 wissenschaftliche Hilfskraft seit dem 01. 04. 1981 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Universität in Düsseldorf